Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Bc. Anéta Szamos

Fytoextrakce psychofarmak jako model kontaminace potravních řetězců

Phytoextraction of psychopharmaceuticals as a model of contamination of food chains

Diplomová práce

Školitel: doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že jsem všechny použité rameny řádně citovala.

V Praze dne ……

……

Anéta Szamos

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., za vedení mé diplomové práce, konzultace a kritické přečetní. Též bych chtěla poděkovat ostatním členům skupiny biochemické katedry zejména RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za pomoc a příjemnou atmosféru. V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině, příteli a přátelům za morální podporu během studia.

Abstrakt:

Fytoextrakce psychofarmak představuje důležitý model pro studium kontaminace potravních řetězců a jejího dopadu na ekosystémy. Tyto látky, často vylučované do odpadních vod, mohou být absorbovány rostlinami, což vede k jejich akumulaci v potravinovém řetězci. Schopnost rostlin absorbovat a akumulovat psychofarmaka je důležitá pro snižování ekotoxikologického rizika. Standardní čistírny odpadních vod nejsou dostatečně účinné v odstranění těchto látek. Vzhledem k nastupujícím požadavkům na snížení kontaminace organických sloučenin ve výpustích čistíren odpadních vod se intenzivně studují metody následného dočišťovaní vypouštěných vod.

Cílem této diplomové práce je analýza fytoextrakce léčiv trazodonu a escitalopramu, které patří mezi antidepresiva, a také buspironu, který patří mezi anxiolytika. Studium extrakční účinnosti bylo provedeno v modelovém systému *in vitro* sterilní kultivace rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L.) s počáteční koncentrací kontaminantu 5 mg/l. Po kultivaci 5–8 dní byl nalezen pokles vstupní koncentrace o 22,8 % u trazodonu, o 30 % u escitalopramu a 22,7 % u buspironu. Koncentrace kontaminantů byly průběžně sledovány pomocí HPLC s UV detekcí.

V rostlinách kultivovaných na kontaminovaném médiu byly dále sledovány vybrané biochemické parametry rostlinného metabolismu jako vliv přítomnosti léčiv na antioxidační, biotransformační a obranný systém rostlin. V rostlinách léčiva významně ovlivnila obsah fenolických látek, antioxidační kapacitu, vybrané enzymové aktivity, zejména aktivitu proteas, a také obsah proteinu teplotního šoku (HSP70), což může být důsledkem zvýšené indukce obranných mechanismů proti abiotickému stresu vyvolanému danými léčivy. V kultivačním médiu byla také detekována přítomnost fenolických látek, antioxidantů a proteinů, které byly patrně rostlinami sekretovány jako odpověď na tuto abiotickou formu stresu.

Klíčová slova: antidepresiva, buspiron, trazodon, escitalopram, fytoextrakce, *Zea mays*, ekochemie, rostlinný stres, antioxidační systém, biotransformace.

Abstract:

Phytoextraction of psychopharmaceuticals is an important model for studying contamination of food chains and its impact on ecosystems. These substances, often excreted in wastewater, can be absorbed by plants, leading to their accumulation in the food chain. The ability of plants to absorb and accumulate psychopharmaceuticals is important for reducing ecotoxicological risk. Standard wastewater treatment plants are not sufficiently effective in removing these substances. In view of the emerging requirements to reduce the contamination of organic compounds in wastewater treatment plant discharges, methods for post-treatment of discharged water are being intensively studied.

The aim of this thesis is to analyze the phytoextraction of the drugs trazodone and escitalopram, which belong to antidepressants, and also buspirone, which belongs to anxiolytics. The extraction efficiency study was carried out in an in vitro sterile culture model system of maize (*Zea mays* L.) plants with an initial contaminant concentration of 5 mg/L. After cultivation for 5-8 days, a decrease of 22.8% in the initial concentration was found for trazodone, 30% for escitalopram and 22.7% for buspirone. Contaminant concentrations were continuously monitored by HPLC with UV detection.

Selected biochemical parameters of plant metabolism, such as the effect of the presence of drugs on antioxidant, biotransformation and defence systems of plants, were further investigated in plants cultured on contaminated medium. In plants, the drugs significantly affected the content of phenolic compounds, antioxidant capacity, selected enzyme activities, especially protease activity, and the content of heat shock protein (HSP70), which may be due to the increased induction of defense mechanisms against abiotic stress induced by the drugs. The presence of phenolic compounds, antioxidants and proteins, which were probably secreted by the plants in response to this abiotic stress, was also detected in the culture medium.

Keywords: antidepressants, buspirone, trazodone, escitalopram, phytoextraction, Zea mays, ecochemistry, plant stress, antioxidant system, biotransformation.

Obsah

1. ÚVOD ..... CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.

1.1. PŘÍČINY A NÁSLEDKY KONTAMINACE LÉČIVÝMI LÁTKAMI 1
1.2. HLAVNÍ ZDROJE A CESTY ZNEČIŠTĚNÍ EKOSYSTÉMU 3
1.3. VLIV REZIDUÍ LÉČIV NA ŽIVÉ ORGANISMY 4

2. EKOSYSTÉM A LÉČIVA 5

2.1. CHOVÁNÍ LÉČIV V POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VODÁCH 5
2.2. ZDROJE LÉČIV V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ 6

3. FYTOREMEDIACE 7

3.1. FYTOREMEDIÁČNÍ TECHNOLOGIE 8
3.1.1. Rhizofiltrace/fytofiltrace 8
3.1.2. Fytoextrakce 9
3.1.3. Fytostabilizace 9
3.1.4. Fytodegradace 9
3.1.5. Fytovolatizace 10
3.2. PERSPEKTIVA A OMEZENÍ FYTOREMEDIACE 10
3.2.1. Perspektiva 10
3.2.2. Omezení 10

4. ANTIDEPRESIVA 11

4.1. KLASIFIKACE ANTIDEPRESIV 11
4.2. FUNGOVÁNÍ ANTIDEPRESIV 11
4.3. TRAZODON 12
4.3.1. Využití trazodonu v medicíně 13
4.4. ESCITALOPRAM 14
4.4.1. Využití escitalopramu a citalopramu v medicíně 14

5. ANXIOLYTIKA 15

5.1. EFEKTY ANXIOLYTIK 15
5.2. BUSPIRON 17
5.2.1. Využití buspironu v medicíně 17

6. BIOCHEMICKÁ ODPOVĚĎ ROSTLIN NA PŘÍTOMNOST LÉČIV V PROSTŘEDÍ 18

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 22

7.1. PŘÍSTROJE 22
7.2. CHEMIKÁLIE 22
7.3. ROSTLINNÝ MATERIÁL 23
7.4. POSTUP 24
7.4.1. Sterilní kultivace rostlin 24
7.4.2. Odběr vzorků pro analýzu 25
7.4.3. Analýza HPLC 25
7.5. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA 25
7.5.1. Stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS 25
7.5.2. Stanovení fenolických látek 26
7.5.3. Stanovení obsahu peroxidu vodíku 27
7.5.4. Stanovení obsahu malondialdehydu 27
7.5.5. Stanovení množství proteinů v listech a kořenech dle Bradforda 28
7.5.6. Stanovení množství proteinů v kultivačním médiu pomocí kyseliny bicinchoninové 29
7.5.7. Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymových aktivit 29
7.6. NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA 30
7.6.1. Postup přípravy gelu pro elektroforézu 30

7.6.2. Průběh elektroforézy ... 31
7.6.3. Detekce aktivity a isoforem enzymů v gelu ... 31
7.6.4. Celkové peroxidasy ... 32
7.6.5. Glutathion-S-transferasa ... 32
7.6.6. Glutathionperoxidasa ... 32
7.6.7. Želatinová zymografie pro stanovení aktivity proteas ... 32
7.6.8. Stanovení aktivity volných peroxidas ... 33
7.6.9. Stanovení aktivity fosfatas ... 33
7.6.9.1. Kyselé fosfatasy ... 34
7.6.9.2. Alkalické fosfatasy ... 34
7.6.10. Stanovení aktivity β-glukosidasy ... 34
7.7. IMUNOCHEMICKÁ ANALÝZA ... 35
7.7.1. Imunochemické stanovení HSP a chalkonsynthasy ... 36

8. VÝSLEDKY ... 37

8.1. KALIBRACE HPLC ... 37
8.2. FYTOEXTRAKČNÍ EXPERIMENTY ... 37
8.2.1. Fytoextrakce escitalopramu ... 37
8.2.2. Fytoextrakce buspironu ... 39
8.2.3. Fytoextrakce trazodonu ... 40
8.3. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA ROSTLIN V LISTECH A KOŘENECH ... 42
8.3.1. Stanovení množství proteinů ... 42
8.3.2. Stanovení antioxidační kapacity ... 43
8.3.3. Stanovení fenolických látek ... 45
8.3.4. Detekce malondialdehydu ... 47
8.3.5. Detekce isoforem a aktivity celkových volných peroxidas ... 47
8.3.6. Detekce isoforem a aktivity glutathion-S-transferas ... 49
8.3.7. Detekce isoforem a aktivity glutathionperoxidas ... 50
8.3.8. Detekce aktivity proteas ... 51
8.3.9. Stanovení aktivity alkalických a kyselých fosfatas ... 52
8.3.10. Stanovení aktivity β-glukosidasy ... 54
8.4. IMUNOCHEMICKÁ ANALÝZA ... 55
8.4.1. Detekce cytosolové formy HSP70 v listech a kořenech ... 55
8.4.2. Detekce chalkonsynthasy v listech a kořenech ... 56
8.5. ANALÝZA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ ... 57

9. DISKUSE ... 60

10. ZÁVĚR ... 66

11. POUŽITA LITERATURA ... 67

12. PŘÍLOHA ... 77

Seznam zkratek

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

FDA – Food and Drug Administration

DMS – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

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

MDA – malondialdehyd

BSA – hovězí sérový albumin

BCA – kyselina bicinchoninová

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

DTT – dithiotreitol

TEMED – N,N,N´,N´- tetramethylethylendiamin

CDNB – 1-chloro-2,4-dinitrobenzen

NBT – nitro blue tetrazolium chlorid

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)

PMS – fenazinmethosulfát

DAB – 3,3´-diamidobenzidin

SDS – dodecylsíran sodný

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

ROS – reaktivní formy kyslíku

TCA – kyselina trichloroctová

TBA – kyselina thiobarbiturová

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

ABA – kyseliny abscisová

1. Úvod

Léky jsou přípravky, které obsahují farmakologicky účinné látky a slouží k prevenci, diagnostice a léčbě nemocí. Léčiva, která se vyznačují farmakologickou aktivitou, mají obecně vlastnosti měnit funkční stav organismu [1]. V toxikologických studiích se před zavedením léčiv do lékařské praxe zpravidla důkladně zkoumají jejich vedlejší účinky na zdraví lidí a zvířat. Nicméně potenciální vlivy výroby a používání léčiv na životní prostředí se staly předmětem vědeckého zájmu teprve nedávno [2].

Metabolity léčiv jsou obvykle polární látky rozpustné ve vodě, které vznikají v důsledku biotransformačních procesů v organismu. V řadě případů nejsou metabolity léčiv ve srovnání s jejich původními sloučeninami biologicky aktivní. Nicméně některé metabolity mohou být účinnější než původní léčivé látky zavedené do organismu [3]. První důkazy o kontaminaci životního prostředí léčivy byly zjištěny v 70. letech 20. století. Léčiva byla poprvé nalezena v odpadních vodách z čistírny odpadních vod Big Blue River v Kansasu (USA) v roce 1976. Relativně malá pozornost byla věnována léčivým látkám a jejich metabolitům jako potenciálním kontaminantům životního prostředí, protože představují pouze malý podíl znečišťujících látek (pesticidů, produktů domácí péče a osobní hygieny) přítomných v životním prostředí. Kromě toho stále není zcela jasné, jak tyto chemické látky ovlivňují ekosystémy. Na konci 20. století se zjistilo, že i malé průniky léčiv a jejich metabolitů do ekosystému mají vliv na životní prostředí a živé organismy, a začaly být zařazovány do kategorie sledovaných polutantů. V současné době byly léky a jejich metabolity detegovány v odpadních a podzemních vodách, půdě, rostlinách a živočišných tkáních [4-6].

1.1. Příčiny a následky kontaminace léčivými látkami

Léčiva a jejich metabolity se do životního prostředí dostávají různými způsoby. Léčiva, jejichž doba použitelnosti vypršela nebo nebyla plně využita, se mohou nacházet na skládkách, protože je lidé likvidují společně s komunálním odpadem. Ve většině případů však léky vyloučené lidskou močí a výkaly končí v odpadních vodách a následně v čistírnách odpadních vod. Čistírny odpadních vod odstraňují organické složky, které obsahují bílkoviny, sacharidy a lipidy. Tato zařízení však nejsou schopna účinně odstranit léčiva a jejich metabolity, a proto se tyto látky nacházejí v odtocích čistíren a následně kontaminují povrchové vody. Farmaceutické látky mohou být ve ekosystému nesnadno rozložitelné, a i v případě

rozložitelných substancí jsou tyto neustále doplňovány z přítoku čistíren, takže se chovají jako perzistentní polutanty. [4, 5]. V současné době neexistují žádná běžně dostupná zařízení na čištění odpadních vod, která by se zaměřovala na odstraňování metabolitů léčiv nebo jiných neregulovaných kontaminantů, jako jsou například výrobky osobní hygieny [7].

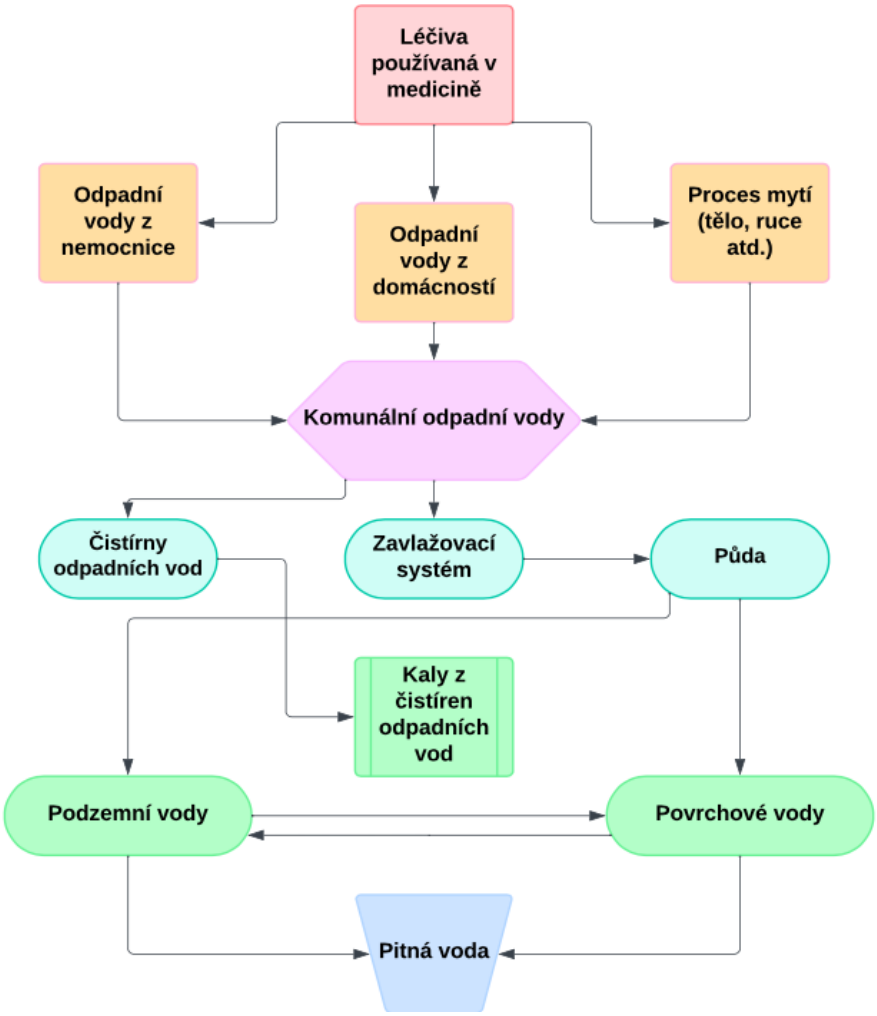
V rámci projektu EU „Rempharmawater“ byly v čistírně odpadních vod v Göteborgu (Švédsko) zjištěny koncentrace více než 20 farmaceutických látek patřících do různých terapeutických skupin. Bylo zjištěno, že šest léčivých látek (karbamazepin, diklofenak, kyselina klofibrová, ofloxacin, sulfamethoxazol a propranolol) přítomných v odpadních vodách je odolných vůči abiotické degradaci. Ibuprofen, který je protizánětlivým a analgetickým terapeutikem a široce se používá v lékařství, byl zjištěn ve zvláště vysoké koncentraci. Jeho koncentrace byla 7 mg/l [8]. Kromě toho bylo zjištěno, že nízká degradovatelnost mnoha léčivých látek umožňuje jejich šíření nejen prostřednictvím vodních organismů, ale následně jsou kontaminovány i suchozemské potravní řetězce [9].

Ve všech zemích dnes probíhá intenzivní vývoj farmaceutických výrobků, což zvyšuje riziko výskytu velkého množství falšovaných, nekvalitních a prošlých výrobků. Kromě toho může existovat riziko nedodržení nebo porušení podmínek skladování a nesouladu vybavení zdravotnických podniků s moderními požadavky na bezpečnost životního prostředí. Podle odborníků jsou farmaceutické produkty získané chemickou syntézou stejnými znečišťovateli životního prostředí jako průmyslový odpad. Na rozdíl od známých toxických látek znečišťujících životní prostředí, jako jsou těžké kovy a pesticidy, jsou léčiva specializovaná pro individuální použití a jejich uvolňování do životního prostředí nemá žádná geografická, klimatická ani jiná omezení [10].

V současné době dochází k intenzivní kontaminaci léčivy celosvětově. Studie z posledních let zjistily, že v mnoha ekosystémech po celém světě, a dokonce i na tak vzdálených místech, jako je Arktida, se nachází více než 150 lékařských a veterinárních léčiv. Podle U.S. Geological Survey je 80 % povrchových vod a přibližně 25 % podzemních vod ve Spojených státech kontaminováno léčivy [11]. Tato léčiva jsou z různých terapeutických tříd, jako jsou analgetika, beta-blokátory, selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), fibráty, antiepileptika a steroidy. Z ekologicko-hygienického hlediska jsou pro ekosystém nejnepříznivější antibiotika, léky s cytotoxickými a hormonálně-modulačními účinky [4, 10].

1.2. Hlavní zdroje a cesty znečištění ekosystému

Z hlediska životního prostředí důležitou etapou životního cyklu léčiv je spotřeba, produkce a nakládání s odpady. Kontaminace životního prostředí je reálná v každé z těchto etap ale dochází k tomu hlavně při jejich používaní [12].



Obrázek 1: Hlavní zdroje a cesty znečištění ekosystému [12].

Ne všechen farmaceutický odpad se však dostává do životního prostředí v důsledku nesprávného použití nebo likvidace. Mnohé z nich se mohou do životního prostředí uvolňovat vylučováním léčiv při metabolismu lidí a zvířat. Například antibiotika, antidepresiva a hormony se mohou vylučovat močí a dostávat se do životního prostředí prostřednictvím odpadních vod. Tyto látky mohou mít negativní dopad na vodní ekosystémy, včetně ryb a dalších vodních organismů.

Farmaceutický odpad může mít negativní dopady i na suchozemské ekosystémy. Některé farmaceutické látky se například mohou dostat do půdy vylučováním v moči zvířat nebo používáním hnoje v zemědělství. To společně s průsaky z kontaminovaných povrchových vod může vést ke kontaminaci půdy a zhoršení její kvality pro zemědělskou produkci [11,12].

Kromě toho mohou mít rezidua farmak v ekosystému negativní účinky na lidské zdraví. Rezidua léčiv mohou mít toxické účinky na lidský nebo zvířecí organismus, pokud se dostanou do potravního řetězce. To může vést k různým onemocněním a zdravotním problémům [12].

1.3. Vliv reziduí léčiv na živé organismy

Farmaceutické látky jsou vysoce aktivní biologické látky, které specificky zasahují do regulačních mechanismů organismu: mohou ovlivňovat metabolismus, měnit hormonální rovnováhu nebo měnit signalizaci mezi buňkami, což je jen několik příkladů jejich možných účinků. Vzhledem k jejich biologické aktivitě a široké škále specifických účinků je zřejmé, že léčiva mohou mít při vstupu do životního prostředí vliv i na ostatní živé organismy.

Například běžně používaná antibiotika mají inhibiční účinek nejen na patogenní bakterie, ale také na růst řas a rostlin. Je známo, že lék proti bolesti diklofenak je škodlivý pro zvláště citlivé živočichy. Například před několika lety byly na indickém subkontinentu téměř zcela vyhubeny populace supů několika druhů, protože mrchožrouti otrávili hospodářská zvířata, která byla předtím léčena diklofenakem [13].

Skupiny vědců opakovaně zkoumaly účinky čtyř účinných látek humánních léčiv na pstruhy a kapry. Ukázalo se, že i relativně nízké koncentrace karbamazepinu, metoprololu a diklofenaku [13], které byly rovněž detegovány v životním prostředí, mohou někdy způsobit vážné poškození životně důležitých orgánů ryb, jako jsou játra, ledviny a žábry.

Je známo, že syntetické hormony, jako je 17α-ethinylestradiol (estrogenní komponenta v antikoncepčních přípravcích), mají dlouhodobé účinky na reprodukci ryb, a to i při velmi nízkých koncentracích. V jednom experimentu skupina vědců zkoumala účinky chronického působení nízkých dávek tohoto hormonu na přirozenou populaci ryb v jezeře. V pokusu, který trval sedm let, se ukázalo, že tento syntetický estrogen v koncentracích 5 až 6 ng/l téměř zastavil reprodukci tloušťů, a nakonec vedl k poklesu populace. Tato studie jasně ilustruje

riziko dlouhodobých účinků nízkých koncentrací hormonů, které se mohou vyskytovat lokálně, a to i v životním prostředí, např. v odpadních vodách [13-15].

2. Ekosystém a léčiva

Léčiva a jejich metabolity, které mají široké spektrum metabolické aktivity, se objevují v rostoucích koncentracích jak vodních, tak i pozemských ekosystémech. Přítomnost těchto látek v životním prostředí může mít nepředvídatelné ekologické důsledky a negativně ovlivnit lidské zdraví a zdraví volně žijících zvířat. Farmaceutické znečištění prostředí se tak stalo celosvětovým problémem, který si žádá odpovídající pozornost.

Různé zdroje uvádějí, že celosvětová spotřeba farmaceutických látek přesahuje ročně 3 miliony tun. Mnohé studie poukazují na vysoké koncentrace různých léčiv ve vodních ekosystémech. Odpadní voda může obsahovat přes 100 různých léčiv [16,17]. Různé studie prokázaly, že koncentrace léčiv v těchto odpadních vodách může dosahovat několika stovek až tisíců mg/dm^3 [18,19]. Přírodní rozklad léčiv a jejich transformace během biologického čištění odpadních vod v čistírnách může navíc vést k tvorbě dalších sloučenin, které mohou mít vyšší toxicitu a zvýšenou perzistenci než původní látky.

2.1. Chování léčiv v povrchových a odpadních vodách

Zbytky léčiv a jejich metabolity se ve velkém množství dostávají do životního prostředí v důsledku fyziologické exkrece lidí a zvířat a také jsou důsledkem likvidace domácího farmaceutického odpadu. Léčivé látky byly nalezeny v odpadních, přírodních vodách a v pitné vodě v USA, Evropě a mnoha dalších zemích.

Léčiva jsou vyvíjena za účelem působení na lidský organismus, ale vzhledem k podobnosti fyziologických mechanismů různých biologických druhů mohou léčiva ovlivňovat i jiné organismy, které tvoří ekosystémy, a to na individuální, druhové a mezidruhové úrovni. Toto pochopení umožňuje zařadit výzkumný směr zaměřený na studium životního cyklu léčiv v životním prostředí a vlivu zbytků léčiv na různé živé organismy do oblasti ekologické toxikologie, konkrétně ekologické toxikologie léčiv. [20]

Léčiva můžeme obecně chápat jako xenobiotika a většina z nich z nich podléhá metabolismu v lidském těle. Úkolem metabolismu je obvykle modifikovat lipofilní látky ve smyslu zvýšení polarity, aby byla usnadněna jejich následná, především ledvinová, exkrece.

Parametry metabolismu jsou individuální pro každou látku a závisí na pohlaví, rase, věku a fyziologickém stavu organismu. Existují dvě fáze metabolismu, jejichž pořadí nemusí nutně odrážet jejich skutečnou posloupnost [21].

V první fázi metabolismu dochází k oxidativním, redukčním nebo hydrolytickým přeměnám molekuly, které zvyšují její polaritu. Ve druhé fázi metabolismu dochází ke konjugaci xenobiotika s endogenními molekulami, které zlepšují transportní vlastnosti metabolitu. Během metabolismu často dochází k inaktivaci účinné látky, což může vést k její neschopnosti dále působit biologicky v původním smyslu. Není však vyloučeno jiné působení na živé organismy.

Nicméně mnoho léčiv buď metabolismu nepodléhá, nebo jen částečně. To znamená, že aktivní molekula účinné látky je vylučována nezměněná buď močí, nebo ve stolici a může dále působit biologicky. Výzkumy navíc ukazují, že glukuronidové transportní komplexy aktivních molekul některých léčiv, vznikající během druhé fáze metabolismu, se snadno rozkládají během procesů čištění odpadních vod a uvolňují nezměněnou účinnou látku do vodní fáze nebo do čistírenského kalu [21,22].

2.2. Zdroje léčiv v životním prostředí

Abychom mohli posoudit rozsah problému, vezměme si příklad. Ve Francii se antibiotikum amoxicilin spotřebovává v průměru v množství 385,6 tun ročně (průměrná hodnota za období 1999–2006) [23]. Při úrovni jeho exkrece 60 % se do kanalizačních sítí ve Francii každoročně dostává více než 230 tun tohoto antibiotika v přepočtu na čistou účinnou látku. Takto velké vypouštění do životního prostředí samozřejmě nemůže zůstat bez povšimnutí pro ekosystémy ani se stát v podmínkách průmyslové výroby. A vezmeme-li v úvahu, že celková spotřeba farmaceutických substancí ve světě přesahuje 3 miliony tun ročně [24], je možné předpokládat, že množství účinných látek různých léčiv, které se dostávají do životního prostředí v důsledku fyziologické exkrece, činí stovky tisíc tun ročně.

Dalším významným zdrojem léčiv v životním prostředí jsou nepoužitá léčiva. V domácích lékárničkách obyvatel vyspělých zemí se hromadí velké množství léků, které zůstávají nevyužity po ukončení léčby nebo byly zakoupeny bez přímé potřeby, do zásoby. Například v jedné studii provedené v USA bylo zjištěno, že pouze 2 % ambulantních pacientů dokončí léčbu bez zbytků léků [25]. V jiné studii provedené ve Velké Británii bylo zjištěno, že 52,8 % všech respondentů dokončuje předepsané léčebné kůry. Z toho 79,2 % respondentů plně

využívá analgetika, 17,6 % dobere předepsaná antibiotika, 46,8 % dokončí terapii betablokátory a 53,7 % antidepresivy [26].

Hlavními příčinami vedoucími k hromadění farmaceutického odpadu v domácnostech jsou:

- dostupnost léčiv, včetně úplné nebo částečné úhrady nákladů na jejich pořízení v některých zemích;
- aktivní reklama farmaceutických společností zaměřená na zvýšení spotřeby léčiv;
- polypragmazie (včetně vlivu farmaceutické reklamy);
- samoléčba a autodiagnostika;
- pokročilý věk a/nebo přítomnost chronických onemocnění u obyvatel domácnosti;
- přítomnost malých dětí v rodině.

Nahromaděná léčiva se stávají nepoužitelnými v důsledku porušení původního balení, působení nepříznivých skladovacích podmínek nebo po uplynutí doby použitelnosti. Poté jsou buď splachována do kanalizace, nebo vyhazována spolu s běžným odpadem.

3. Fytoremediace

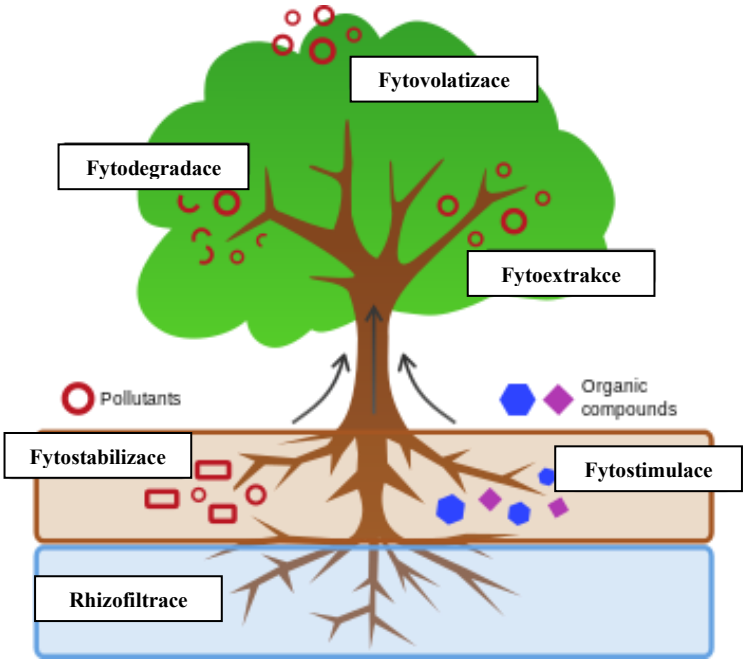
Fytoremediační technologie byla zprvu vyvinuta a testována pro odstraňování iontů těžkých kovů. Postupem doby však začala být zkoumána a uplatňována i pro odstraňování organických sloučenin, neboť rostliny se vyznačují i extrakčním potenciálem pro organické látky. Základní principy a postupy pro obě tyto skupiny kontaminantů však zůstávají v podstatě stejné. Znečištění přírodního prostředí ionty těžkých kovů představuje pro biosféru velké nebezpečí. Kromě přímých toxických účinků na živé a rostlinné organismy mají těžké kovy tendenci kumulovat se v potravních řetězcích, což zvyšuje jejich nebezpečnost pro člověka. Jakmile se dostanou do vodních útvarů, zůstávají dlouho v nejnebezpečnější iontové formě, a i když jsou ve vázaném stavu (koloidní forma, dnové sedimenty nebo jiné špatně rozpustné sloučeniny), představují potenciální hrozbu ještě dlouho. Zvýšený obsah těžkých kovů v těle vede k onemocněním kardiovaskulárního systému, způsobuje těžké formy alergií. Kromě toho mají těžké kovy embryotropní vlastnosti a jsou karcinogenní [27].

Analýza v současnosti široce používaných metod odstraňování těžkých kovů z přírodních objektů, jako je půda a vodní plochy, ukazuje, že jsou spojeny s tvorbou velkého množství toxických kalů, jsou nákladné a obtížně proveditelné. Proto je naléhavě nutné hledat a vyvíjet metody, které umožňují extrakci ekotoxických látek bez dalšího zatížení životního prostředí.

Za nespornou prioritu z hlediska ekologické a ekonomické účinnosti je uznávána metoda ***fytoremediace*** [28] - technologie čištění půdy a průmyslových odpadních vod s využitím přírodních a geneticky modifikovaných rostlin, která vznikla spojením dvou latinských slov „phyto“ - rostlina a „remedium“ - čistit, obnovovat [29]. Poslední desetiletí se vyznačují intenzivním rozvojem tohoto přístupu [30,31]. Zpráva americké Agentury pro ochranu životního prostředí za rok 2000 tak popisuje 194 výzkumných projektů v oblasti fytoremediace, z nichž 33 (17 %) se věnuje čištění životního prostředí od těžkých kovů [32]. V domácí vědě se věnuje velká pozornost využití fytoremediačních technologií pro kontrolu znečištění těžkými kovy [33-37]. Podstatná část z nich je však věnována úpravě půdy [35-37] a jako modelové objekty byli častěji využíváni zástupci vodní vegetace [33, 34].

3.1. Fytoremediáční technologie

Fytoremediace zahrnuje 5 hlavních přístupů a podle toho se dělí na 5 technologií: rhizo– a fytofiltraci, fytoextrakci, fytostabilizaci, fytodegradaci a fytovolatizaci [38].



Obrázek 2: Schéma fytoremediačních technologií [39].

3.1.1. Rhizofiltrace/fytofiltrace

Rhizofiltrace spočívá v průchodu odpadních vod přes rhizofiltrační jednotky s hydroponicky pěstovanými vyššími suchozemskými rostlinami, dlouhými, vláknitými a hustými, pokrytými vlásečnicovými kořeny. Kořenový systém potom absorbuje, koncentruje nebo sráží těžké kovy [40]. Podle stejných principů se provádí také čištění odpadních vod od

iontů těžkých kovů pomocí vyšších vodních rostlin (makrofyt), tato metoda se nazývá ***fytofiltrace*** [41].

Fytofiltraci odpadních vod lze provádět dvěma způsoby:

1) ve fytofiltračním systému – průchodem toku odpadní vody s regulovaným pH, teplotou a rychlostí přes akvária s rostoucími makrofyty [42].

2) pomocí tzv. botanických lokalit, kterými se rozumí široká škála vodních toků přirozeně porostlých makrofyty nebo v nich uměle vysazených. Zpravidla se jedná o bažinaté oblasti s pomalou rychlostí proudění na cestě do větších vodních ploch [43,44].

Když se makrofyta nasytí těžkými kovy, kontaminovaná biomasa (celá nebo nad hladinou vody) se odstraní nebo pokosí. Biomasa se poté obvykle likviduje spálením za řízených podmínek.

3.1.2. Fytoextrakce

Fytoextrakce je pěstování speciálně vybraných druhů rostlin po určitou dobu na kontaminovaných místech s cílem extrahovat těžké kovy z půdy kořenovým systémem a maximalizovat jejich koncentraci v nadzemní biomase [45, 46].

3.1.3. Fytostabilizace

Fytostabilizace – fyzikální a chemická imobilizace znečišťujících látek jejich sorpcí na kořenech a chemickou fixací různými přísadami v půdě s cílem stabilizovat toxické látky a zabránit jejich šíření větrnou a vodní erozí; snížit vertikální migraci znečišťujících látek do podzemních vod. Může být použita jako dočasná strategie ke snížení environmentálních rizik do doby, než bude zvolena nejvhodnější technologie čištění. [46].

3.1.4. Fytodegradace

Jedná se o techniku používanou k dekontaminaci kontaminovaného místa pomocí rostlin. Nazývá se také ***fytotransformace***, kdy se organické znečišťující látky rozkládají nebo přeměňují na jiné nebo méně škodlivé, jednodušší formy znečišťujících látek, které rostliny zachycují a zabudovávají do svých tělních tkání. Rostliny mají některé enzymy, které se používají k rozkladu chlorovaných rozpouštědel, jako je trichlorethylen a muniční odpad. [46].

3.1.5. Fytovolatizace

Fytovolatizace je proces, při kterém rostliny adsorbují kovy, jako je rtuť a selen, z půdy, biologicky je v rostlině přeměňují na plynnou formu a uvolňují je do atmosféry.
Čistící efekt je způsoben tím, že plynná forma těchto kovů je mnohem méně toxická, například u selenu se toxicita snižuje 500-600krát [47,48]. I přes další výhody (minimální změna čištěného povrchu, minimální potřeba údržby po výsadbě, prevence erozních procesů, absence nutnosti likvidace rostlinné biomasy), nelze při použití fytovolatilizace na rozdíl od jiných fytoremediačních technologií kontrolovat migraci kontaminantů vnášených do prostředí. Proto je fytovolatilizace nejkontroverznějším způsobem fytoremediační technologie [47].

3.2. Perspektiva a omezení fytoremediace

3.2.1. Perspektiva

- Náklady na fytoremediaci jsou nižší než náklady na tradiční postupy, a to jak in situ, tak ex situ.
- Možnost zpětného získání a opětovného využití cenných kovů (společnostmi specializujícími se na „fytoremediaci“).
- Zachování svrchní vrstvy půdy, udržení půdní úrodnosti.
- Zlepšuje stav půdy, výnosy plodin a fytochemikálie v rostlinách.
- Použití rostlin také snižuje erozi a vyplavování kovů v půdě.

3.2.2. Omezení

- Fytoremediace je omezena plochou a hloubkou, kterou zabírají kořeny.
- U remediačních systémů založených na rostlinách není možné zcela zabránit vyplavování kontaminantů do podzemních vod (bez úplného odstranění kontaminované půdy, což samo o sobě problém kontaminace neřeší).
- Bioakumulace kontaminantů, zejména kovů, v rostlinách může ovlivnit spotřebitelské produkty, jako jsou potraviny a kosmetika, a vyžaduje bezpečnou likvidaci zasaženého rostlinného materiálu.
- Při absorpci těžkých kovů se někdy kovy vážou na půdní organickou hmotu, čímž se stávají nedostupnými pro extrakci rostlinou [48-50].

4. Antidepresiva

Antidepresiva jsou v dnešním světě předepisována velmi, velmi často. Antidepresiva regulují v mozku hladiny chemických látek (neurotransmiterů), které ovlivňují náladu a emoce. Když člověk trpí bolestí srdce a úzkostí z deprese, může se zdát, že léky jsou jednoduchou a pohodlnou metodou úlevy. Pokud je deprese těžká, mohou být antidepresiva obzvláště užitečná a někdy dokonce život zachraňující.

Antidepresiva při léčbě deprese vyžadují poměrně dlouhou dobu aplikace, než začnou účinkovat. Je také důležité si uvědomit, že mohou mít nepříjemné nebo dokonce závažné vedlejší účinky. Často se musí testovat rozdílné typy antidepresiv, aby se našel optimální lék pro terapii konkrétního pacienta.
Antidepresiva se rovněž často kombinují s dalšími způsoby léčby deprese (cvičení, kognitivní a behaviorální terapie) a změnou životního stylu. [51].

4.1. Klasifikace antidepresiv

V současné době existuje několik podskupin léků ze skupiny antidepresiv, které se liší principem účinku a chemickým složením, z nichž jsou nečastější typy:

- Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI);
- Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI);
- Tricyklická antidepresiva (TCA);
- Inhibitory monoaminooxidasy (MAOI);
- Atypická antidepresiva (AAT).

Existují také rostlinná antidepresiva, např. třezalka tečkovaná a šafrán, ale moderní medicína založená na důkazech považuje tyto léky za nedostatečně účinné ve srovnání se syntetickými antidepresivy a doporučuje je pouze u mírných a středně těžkých depresí [52].

4.2. Fungování antidepresiv

Je příznačné, že ani dnes není zcela známo, jak antidepresiva působí, jaký je mechanismus účinku těchto léků. Předpokládá se, že zvyšují hladinu speciálních chemických látek v mozku – neurotransmiterů neboli přenašečů. Bylo zjištěno, že některé neurotransmitery, například serotonin a noradrenalin, souvisejí s náladou a emocemi.

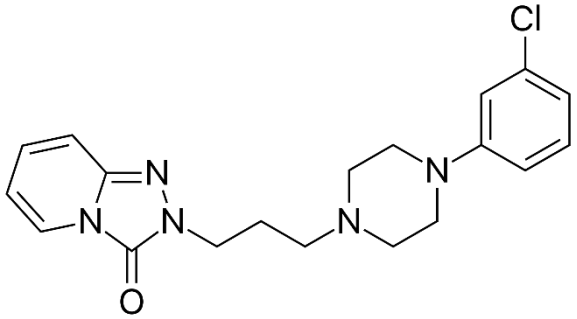
Neurotransmitery mohou také ovlivňovat signály bolesti, které vysílají nervová zakončení, a to může vysvětlovat, proč některá antidepresiva zmírňují dlouhodobou bolest.

Antidepresiva sice mohou léčit příznaky deprese, ne vždy však mohou řešit její příčiny. Proto se k léčbě těžkých depresí nebo jiných duševních poruch obvykle používají v kombinaci s psychoterapií.

Výzkumy potvrzují, že antidepresiva mohou být užitečná pro lidi se středně těžkou až těžkou depresí. U mírné deprese se obecně nedoporučují [53].

4.3. Trazodon

Trazodon je jedinečné atypické serotoninergní antidepresivum se specifickým mechanismem účinku, který se liší od mechanismu účinku všech ostatních známých antidepresiv a je jediným zástupcem ve své třídě. Přestože je znám již od 70. let 20. století, svými receptorovými vlastnostmi, dobrým profilem snášenlivosti a bezpečností patří do III. generace antidepresiv a v některých ohledech jej lze považovat za modernější než selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. Z hlediska celkové účinnosti je srovnatelný s ostatními antidepresivy, ale díky svému mechanismu účinku je často účinný v případech depresivních a úzkostných poruch rezistentních na jiná antidepresiva [54].



Obrázek 3: Chemická struktura trazodonu

4.3.1. Využití trazodonu v medicíně

Trazodon je v současné době dostupný v mnoha zemích světa v různých lékových formách. V USA a některých dalších zemích je znám pod obchodním názvem Desyrel®, v Evropě pod obchodním názvem Trittico®, v Kanadě pod obchodním názvem Trazorel®, ve Velké Británii a Irsku pod obchodním názvem Molipaxin®. Celosvětově je k dispozici ve formě běžných tablet s okamžitým uvolňováním 25, 50, 100 a 150 mg a tablet s prodlouženým uvolňováním 100, 150, 200 a 300 mg. V některých zemích je dostupný také jako perorální kapky a jako injekční roztok.

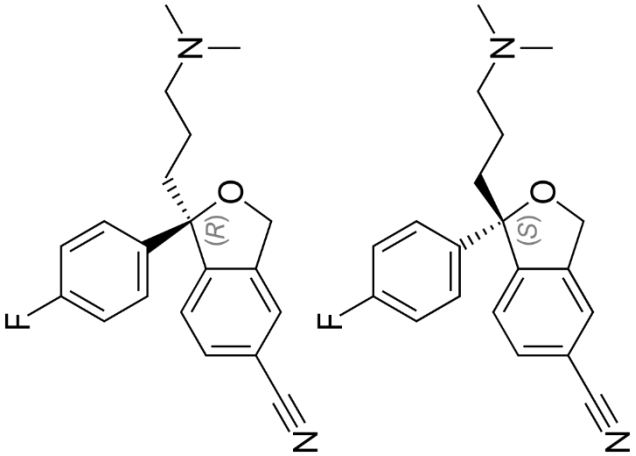
Trazodon je schválen FDA pro léčbu deprese u velké depresivní poruchy nebo unipolární rekurentní depresivní poruchy a v depresivní fázi bipolární afektivní poruchy Trazodon se používá také k léčbě depresivních stavů u schizofrenie a schizoafektivní poruchy, organických depresí a dalších. V léčbě depresivních stavů lze trazodon použít jak v monoterapii, tak v rámci kombinované léčby s jinými léky (včetně jiných antidepresiv) nebo psychoterapie. [54,55].

Obrázek 4: Léčivý přípravek trazodonu [56].

Důležitými vlastnostmi přípravku Trittico jsou také jeho silný sedativní a proti úzkostný účinek, specifický normalizační účinek na fázovou strukturu spánku a cirkadiánní rytmy a silný analgetický účinek. Přípravek Trittico je rovněž účinný při léčbě závislosti na alkoholu, opioidech a benzodiazepinech. [54].

4.4. Escitalopram

Escitalopram patří do druhé generace selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) a je odvozen od citalopramu, thymoanaleptiku stejné skupiny, který je racemickou směsí dvou enantiomerů: neaktivního R-citalopramu a aktivního S-citalopramu. Escitalopram, který je levotočivým (S-) enantiomerem citalopramu, je z hlediska farmakologické aktivity lepší než předchůdce citalopramu, přičemž si zachovává všechny výhody spojené se selektivitou mechanismu účinku. Stejně jako citalopram nemá escitalopram prakticky žádný účinek na noradrenergní, dopaminergní, cholinergní a histaminové receptory. Escitalopram neovlivňuje aktivitu jaterního cytochromového izoenzymového systému, což minimalizuje riziko nežádoucích lékových interakcí při kombinované farmakoterapii [57].



Obrázek 5: Chemická struktura (S) – citalopramu a (R) - citalopramu

4.4.1. Využití escitalopramu a citalopramu v medicíně

Escitalopram je účinné a bezpečné antidepresivum nové generace SSRI se širokým spektrem klinické aktivity. Escitalopram má výrazný thymoanaleptický účinek, který zajišťuje významné a rychlé snížení afektivních příznaků u deprese jakékoli závažnosti. Escitalopram je účinnou léčbou širokého spektra úzkostně-fobických poruch, včetně panické, generalizované a sociální úzkostné poruchy. Účinná denní dávka escitalopramu je nejméně poloviční oproti citalopramu. V léčbě depresivních poruch je escitalopram v dávce 20 mg/den účinnější než citalopram v dávce 40 mg/den.

Escitalopram má příznivý profil snášenlivosti a oproti moderním selektivním antidepresivům (citalopram, paroxetin, venlafaxin) vykazuje výhodu, pokud jde o spektrum

nežádoucích účinků souvisejících s léčbou. Escitalopram má optimální poměr účinnosti a bezpečnosti. Lék nezpůsobuje klinicky významné změny vitálních funkcí, což poskytuje možnost jeho použití nejen u psychiatrických pacientů, ale také v obecné lékařské populaci pacientů s depresí a úzkostně-fobickými poruchami vyskytujícími se na pozadí somatické a neurologické patologie. Použití escitalopramu se zdá být ekonomicky výhodné, což je zřejmě dáno jeho rychlým a výrazným terapeutickým účinkem, stejně jako minimálními nežádoucími účinky a absencí toxicity [57,58].

5. Anxiolytika

Anxioliytika jsou skupinou psychotropních léků s proti úzkostným účinkem, které zmírňují úzkost a vnitřní napětí, třes a svalové napětí neurotického původu, strach. Některé léky této skupiny mohou mít kromě normalizace psychoemočního stavu a účinku na noční spánek také tonizující účinek.

Anxiolytika se předepisují ke zmírnění stavů agitovanosti (a) a astenie (b) provázejících různé duševní poruchy:

a) úzkost, panika, strach, podrážděnost, dysforie, problémy s usínáním, zkrácení doby spánku, autonomní labilita, autonomní krize.
b) chronická únava, hypochondrie, problémy s pozorností a zapamatováním informací, snížená intelektuální aktivita, slabost, únava, letargie, apatie, podrážděnost, nedostatek energie po spánku [59].

5.1. Efekty anxiolytik

- <u>Anxiolytický (proti úzkosti) účinek.</u>

Hlavním úkolem anxiolytik je vyvolat anxiolytický (proti úzkostný) účinek tzv. zmírnit úzkost, obavy, strach (antifobický účinek), snížit emoční napětí. Kromě toho anxiolytika pomáhají zvládat obsedantní myšlenky a hypochondrii, iracionální obavy o vlastní zdravotní stav.

- Sedativní (uklidňující) účinek

Anxiolytika mají sedativní (uklidňující) účinek, který se projevuje snížením hyperaktivity, psychomotorické excitability, rychlosti motorických a psychických reakcí, koncentrace pozornosti. Sedativní účinek lze přičíst doplňkovým anxiolytikům.

- Hypnotický účinek

Při poruchách spánku (obtíže v procesu usínání, při přítomnosti povrchního, na vnější podněty citlivého spánku, jakož i krátkého, pro zotavení nedostatečného spánku), které zpravidla vznikají na pozadí průběhu lehkých a hraničních duševních poruch, pomáhají anxiolytika zvládnout tyto stavy prostřednictvím uspávacího (hypnotického) účinku.

- Myorelaxační (uvolňující) účinek

U psychopatologických stavů způsobujících napětí kosterního svalstva, svalovou a motorickou excitaci je užitečný myorelaxační (uvolňující) účinek anxiolytik. Pokud je však pacientova profesní činnost nebo životní styl spojen s potřebou udržet rychlou psychickou a fyzickou reakci, je třeba přísně volit lék ve správném dávkování. Jinak se může objevit subjektivní pocit letargie a slabosti.

- Antikonvulzivní účinek

Antikonvulzivní účinek anxiolytik se obvykle využívá u stavů provázených epileptogenní aktivitou. Tento účinek nachází terapeutické využití zejména u hysteroepilepsie (neepileptické paroxysmální stavy), nekonvulzivní epilepsie, neuropsychogenních záchvatů (např. zástava dechu, parasomnie, panická porucha, kardiogenní záchvaty, tenzní bolesti hlavy).

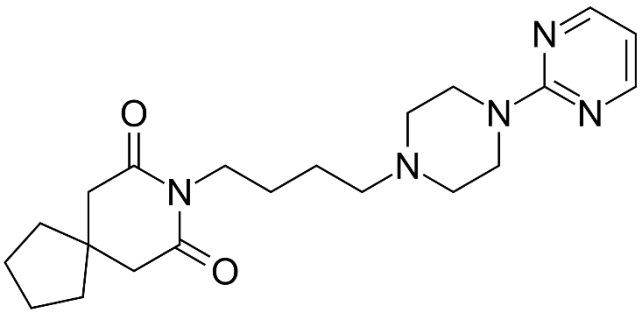
- Vegetostabilizační účinek

Profil terapeutického účinku některých anxiolytik zahrnuje vegetostabilizační účinek – stabilizaci funkční aktivity autonomního nervového systému. Při užívání těchto léků se zastavují vegetativní projevy úzkosti, například: bušení srdce, vysoký krevní tlak, pocení, gastrointestinální poruchy [60,61].

5.2. Buspiron

Buspiron, nebenzodiazepinové anxiolytikum, je selektivní parciální agonista serotoninových 5-HT1A receptorů, selektivní antagonista dopaminových D2-autoreceptorů a slabě afinitní agonista 5-HT2 receptorů.

Hlavní indikací pro použití tohoto přípravku je generalizovaná úzkostná porucha, ale může být užitečný i u jiných úzkostných stavů, zejména u panické poruchy, sociofobie a deprese (jako doplňková léčba). Kromě toho buspiron se používá u dalších neurologických a psychiatrických onemocnění např. pro korekci lékově indukovaných dyskinezí u Parkinsonovy nemoci, ataxie, poruch chování při poranění mozku, demence, syndromu hyperaktivity a poruchy pozornosti. [62].



Obrázek 6: Chemická struktura buspironu

5.2.1. Využití buspironu v medicíně

Nejvíce zkušeností s užíváním buspironu bylo nashromážděno u generalizované úzkostné poruchy.

Klinické studie posledních 30 let provází neustálé zdokonalování nosologické struktury úzkostných poruch. Na počátku 20. století bylo chápání úzkostných poruch poměrně vágní, ale postupem času bylo jejich místo v okruhu ostatních duševních poruch jasněji vymezeno, částečně i pod vlivem farmakologického výzkumu.

Příznaky generalizované úzkostné poruchy jsou chronické a často se vyskytují u pacientů, kteří se dostaví k praktickému lékaři. Tito pacienti obvykle přicházejí s neurčitými somatickými stížnostmi na únavu, svalovou bolest nebo napětí a poruchy spánku.

Buspiron je prvním nebenzodiazepinovým anxiolytickým přípravkem schváleným FDA pro léčbu generalizované úzkostné poruchy na základě prací, které prokázaly, že jeho účinnost je srovnatelná s benzodiazepiny [62].

Podle kritérií DSM-V [63] je generalizovaná úzkostní porucha charakterizována:

1. Nadměrná úzkost a obavy (úzkostná očekávání) vyskytující se ve většině dnů po dobu nejméně 6 měsíců a projevující se v řadě událostí nebo činností (např. při výkonu povolání nebo ve škole).
2. Obtíže s ovládáním úzkosti.
3. Přítomnost alespoň 3 z následujících příznaků po většinu dní po dobu nejméně 6 měsíců: motorický neklid nebo pocit nestability; rychlá únava; obtíže se soustředěním a nesoustředěnost; podrážděnost; svalové napětí; poruchy spánku.
4. Klinicky významné potíže nebo zhoršení sociálních, pracovních a jiných aktivit způsobené úzkostí, neklidem nebo fyzickými (psychomotorickými) příznaky.
5. Tyto poruchy, které nelze vysvětlit fyziologickým účinkem psychoaktivní látky nebo somatickým onemocněním.
6. Tyto poruchy nelze vysvětlit jiným duševním onemocněním.

Buspiron byl také úspěšně použit k profylaktické léčbě migrény a alkoholismu u osob se souběžnou úzkostnou poruchou a k léčbě úzkostné deprese, úzkosti a agitovanosti u pacientů s traumatickým poškozením mozku [64,65].

6. Biochemická odpověď rostlin na přítomnost léčiv v prostředí

Rostliny mohou reagovat na přidání léčiv do růstového média nebo půdy, přičemž tyto reakce jsou závislé na typu látky, její koncentraci a specifických vlastnostech rostliny [66].

Rostliny vystavené stresovým podmínkám, včetně expozice léčivům, často reagují zvýšením antioxidační kapacity. Antioxidační systém rostlin zahrnuje enzymy jako peroxidasy a glutathionperoxidasy, které hrají klíčovou roli v neutralizaci reaktivních forem kyslíku (ROS) a ochraně buněk před oxidačním poškozením. Peroxidasy hrají klíčovou roli při lignifikaci buněčných stěn rostlin, což je proces, který vede k zesílení a zpevnění buněčné struktury. Zvýšená aktivita peroxidas může podporovat tvorbu ligninu, čímž se buněčné stěny stávají méně propustnými pro různé látky, včetně léčiv přítomných v růstovém médiu. Tato snížená

prostupnost může omezit vstup xenobiotik do buněk, což vede k ochraně rostliny před potenciálně toxickými účinky těchto látek. V důsledku toho se může rostlina lépe přizpůsobit a přežít v prostředí s vysokou koncentrací kontaminant.

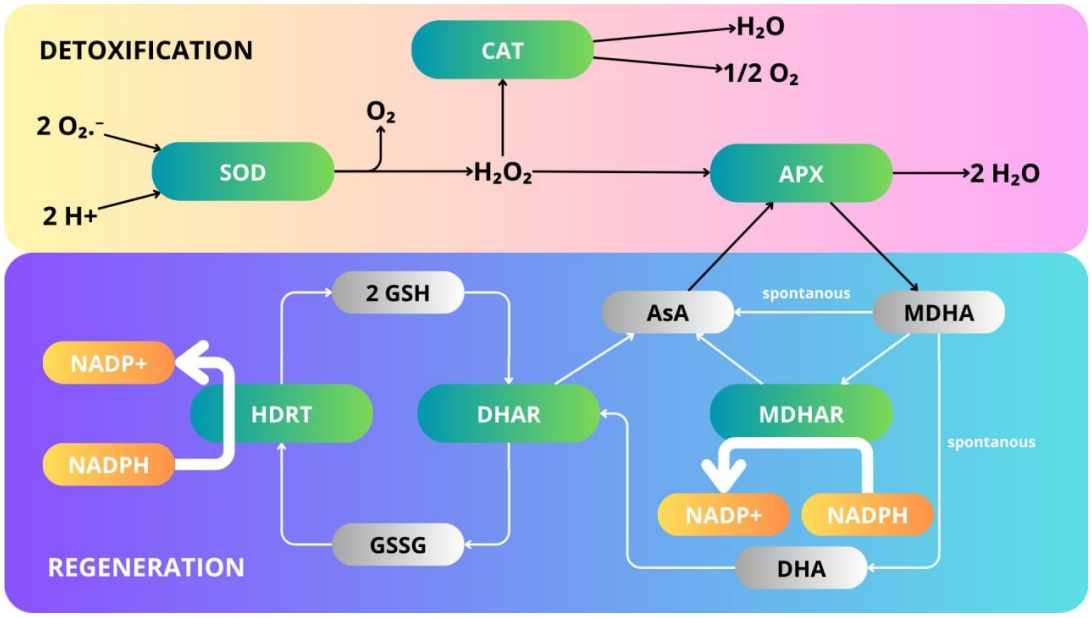
Glutathionperoxidasy (GST), které využívají glutathion a peroxid vodíku jako substráty, rovněž přispívají k detoxikaci ROS a udržování redoxní rovnováhy v buňkách. GST je klíčový biotransformační enzym, který hraje významnou roli v detoxikaci xenobiotik prostřednictvím jejich konjugace s glutathionem. Tímto způsobem může GST modifikovat a detoxikovat kontaminanty, což usnadňuje jejich vyloučení z rostliny a snižuje jejich toxické účinky [67].

Přidání léčiv do růstového média nebo půdy může také ovlivnit aktivitu specifických enzymů v rostlinách. Glutathion-S-transferasy (GST) jsou klíčové enzymy podílející se na detoxikaci xenobiotik, včetně léčiv. Tyto enzymy katalyzují konjugaci glutathionu s reaktivními meziprodukty, čímž usnadňují jejich odstranění z buněk. Aktivita GST je často zvýšena v přítomnosti stresových podmínek, což pomáhá rostlinám zvládat toxické účinky kontaminant [67].

Fenolické látky jsou důležitou skupinou sekundárních metabolitů v rostlinách, které mají silné antioxidační vlastnosti. Produkce fenolických látek je často zvýšena jako odpověď na stres vyvolaný léčivy. Tyto látky mohou neutralizovat ROS a přispívat k celkové antioxidační kapacitě rostliny, čímž pomáhají chránit buňky před oxidačním poškozením. Zvýšená produkce fenolických látek může také souviset s posílením obranných mechanismů rostlin proti patogenům a herbivorům [67].

Rostliny mají schopnost vyextrahovat a transformovat léčiva prostřednictvím různých biochemických cest. Tento proces zahrnuje enzymatické reakce, které mění chemickou strukturu léčiv a usnadňují jejich odstranění nebo detoxikaci. GST a peroxidasy hrají významnou roli v těchto procesech, což umožňuje rostlinám zvládat přítomnost xenobiotik např. farmaceutických látek v prostředí. Biotransformace kontaminant v rostlinách může vést k tvorbě méně toxických nebo snáze odstraněných metabolitů, což snižuje jejich negativní dopad na rostlinné buňky a celkové zdraví rostliny.

Biochemické reakce rostlin na přidání léčiv do růstového média nebo půdy zahrnují komplexní interakce mezi antioxidačními systémy, enzymatickými aktivitami a produkcí fenolických látek. Tyto procesy umožňují rostlinám efektivně zvládat stres a minimalizovat poškození způsobené léčivy. Pochopení těchto mechanismů je klíčové pro aplikace v oblasti fytoremediace a zlepšení růstu rostlin v přítomnosti farmaceutických kontaminantů. Výzkum interakcí mezi xenobiotiky a rostlinami je důležitý nejen pro ochranu životního prostředí, ale také pro vývoj účinných metod k odstranění těchto kontaminant z ekosystémů. Důkladné porozumění těmto procesům může také přispět k inovativním strategiím pro zlepšení odolnosti rostlin vůči různým typům stresu, což má široké ekologické a agronomické dopady [66-67].



. Schéma 1: Antioxidační systém a detoxikace reaktivních forem kyslíku. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

Schéma č. 1 znázorňuje dvě klíčové oblasti v antioxidačním systému buněk: proces detoxikace reaktivních forem kyslíku (ROS) a následnou regeneraci antioxidantů.

V sekci detoxikace (zobrazené v červené části nahoře) superoxiddismutasa (SOD) přeměňuje superoxidový anion (O_2•−) na kyslík (O_2) a peroxid vodíku (H_2O_2). Následně katalasa (CAT) rozkládá peroxid vodíku (H_2O_2) na vodu (H_2O) a kyslík (O_2), což vede k detoxikaci H_2O_2. Askorbát peroxidasa (APX) také přeměňuje H_2O_2 na vodu (H_2O) za pomoci askorbátu (AsA) jako substrátu.

V sekci regenerace (zobrazené v modré části dole) glutathion reduktasa (GR) obnovuje oxidovaný glutathion (GSSG) zpět na jeho redukovanou formu (GSH) za využití NADPH. Dehydroaskorbát reduktasa (DHAR) přeměňuje dehydroaskorbát (DHA) zpět na askorbát (AsA) za pomoci GSH. Monodehydroaskorbát reduktasa (MDHAR) obnovuje monodehydroaskorbát (MDHA) zpět na askorbát (AsA) za použití NADPH.

Detoxikace a regenerace spolu úzce souvisejí, protože produkty detoxikace (např. H_2O_2) jsou rozkládány enzymy (CAT a APX) a výsledné produkty jsou následně regenerovány zpět do jejich aktivní formy v rámci regeneračního cyklu. Tento proces udržuje rovnováhu mezi tvorbou ROS a jejich neutralizací, což je klíčové pro ochranu buněk před oxidačním stresem. Schéma tak znázorňuje, jakým způsobem buňky zajišťují ochranu před poškozením způsobeným reaktivními formami kyslíku a jak regenerují své antioxidanty, aby byly opět připraveny k neutralizaci ROS [68].

Souhrnný článek od Bartikové et al. z roku 2015 [69] se zabývá rolí enzymů, které metabolizují xenobiotika v rostlinách, a jejich schopností přijímat a biotransformovat veterinární léčiva v životním prostředí. Rostliny mají vysoce sofistikované detoxifikační systémy, které zahrnují různé enzymy podobné těm v lidských a živočišných organismech, ale také obsahují specifické enzymy, které jsou unikátní pro rostliny. Studie shrnuje současné poznatky o tom, jak rostliny přijímají veterinární léčiva, transformují je na méně toxické nebo netoxické sloučeniny a ukládají je ve vakuolách a buněčných stěnách. Tato schopnost rostlin může chránit nejen je samotné, ale také další organismy, včetně bezobratlých a býložravců. Studie zdůrazňuje důležitost rostlin v detoxikaci veterinárních léčiv v životním prostředí a uvádí potenciální rizika a důsledky, které tato interakce může přinést. Cílem této přehledové práce bylo zdůraznit význam rostlin v procesu detoxikace veterinárních léčiv v životním prostředí, přičemž byly posouzeny možnosti využití rostlin pro fytoremediační technologie.

7. Experimentální část

7.1. Přístroje

- Centrifuga Spectrafuge TM 16M (Lahner)
- Kahan Fuego pro, WLD – Tec
- Systém HPLC značky Shimadzu, vysokotlaké čerpadlo LC20AD, UV/VIS detektor
- SPD20A, nástřikový kohout Rheodyne, smyčka 20 µl,
- kolona Agilent Eclipse XDB, 5 µm, 250 x 4 mm.
- software Clarity (Data Apex)
- Ultrazvuková lázeň Fisherbrand ® FB 15050
- Automatické pipety Fisherbrand
- analytické váhy XE-100A; Denver Instrument; USA
- aparatura určená pro gelovou elektroforézu; Biorad®; USA
- centrifuga UNIVERSAL 32 R; Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Německo
- laboratorní váha 440-45; KERN®; Německo
- pH metr UltraBasic; model UB-10; Denver InstrumentV USA
- dokumentační systém Uvitec Alliance Q9
- spektrofotometr Multiskan® GO; Thermo Fisher Scientific Oy; Finsko
- třepačka VORTEX 4 basic; IKA®-Werke GmbH & Co. KG; NěmeckoTrans-Blot® TurboTM; Bio-Rad, USA

7.2. Chemikálie

- Savo Original (UNILEVER ČR spol. s.r.o.)
- Acetonitril HPLC Gradient grade (Fisher Science UK)
- Deionizovaná voda pro přípravu medií a mobilních fází z přístroje DEMIWA 3roi (Watek, ČR)
- Escitalopram hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- Trazodon hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- Buspiron hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- Kyselina fosforečná 85 %p.a. (Fluka)
- Ethanol 96 % (Lach-Ner, ČR)
- Fenolové činidlo Folin-Ciocâlteu (VWR Life Science, USA)
- Uhličitan sodný bezvodý (Lachema, ČR)

- Methanol, HPLC grade (Lab-Scan analytical sciences, Polsko)
- 3,3´-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxid vodíku 30 % (Lach-Ner, ČR)
- ABTS roztok obsahující H2O2 (Sigma-Aldrich, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA) 21
- Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol bezvodý (Lach-Ner, ČR)
- Glycin (Lach-Ner, ČR)
- 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 trihydrogenfosforečná, ≥ 85% (Sigma-Aldrich, USA)
- N,N,N´,N´-tetrametyletylendiamin (Thermo, Japonsko)
- Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (Roche, Německo)
- Nitrotetrazoliová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- Glutathion (Sigma-Aldrich, USA)
- Fenazinmethosulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (Sigma-Aldrich, USA)

7.3. Rostlinný materiál

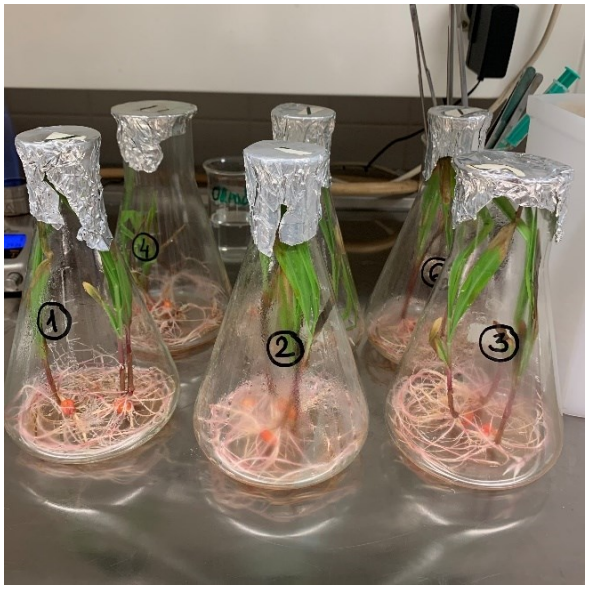
Pro studium fytoextrakce trazodonu, buspironu a escitalopramu byla použita semena kukuřice seté (*Zea mays* L.) polní kultivar DKC 3969 od společnosti Monsanto ČR, s.r.o.

7.4. Postup

7.4.1. Sterilní kultivace rostlin

Na přípravu rostlinných kultur bylo použito 130 semen kukuřice seté (*Zea mays*). Tato semena byla nejprve ponořena na 1 minutu do 70% ethanolu (viz. Obrázek 7). Poté byla sterilizována v 15% roztoku Sava po dobu 10 minut, následně v 10% roztoku Sava po dobu 20 minut. Semena byla třikrát promyta sterilní destilovanou vodou a poté ponechána stát ve sterilní vodě 15 minut. Sterilizovaná semena byla přenesena do 500 ml Erlenmeyerových baněk, do každé baňky byla vnesena 4 semena. Do všech baněk bylo předem přidáno 10 ml Murashige a Skoog média. Semena byla kultivována v kultivační místnosti při teplotě 26 °C a za specifických světelných podmínek (16 hodin světla/8 hodin tmy, zářivky Cool White, 40 W/m² ze vzdálenosti 40 cm). Po 7-10 dnech, kdy rostliny dosáhly požadovaného vzrůstu, bylo k nim přidáno studované léčivo (viz Obrázek 8). Kontaminace kultury byla provedena po odlití média a přidání 100 ml sterilní vodovodní vody přidáním odpovídajícího množství zásobního roztoku léčiva ve vodě tak aby bylo dosaženo odpovídající vstupní koncentrace kontaminantu 5 mg/l.

Obrázek 7: Semena kukuřice v 15% roztoku Sava



Obrázek 8: Odebrání vzorků k analýze

7.4.2. Odběr vzorků pro analýzu

Po přidání trazodonu, escitalopramu a buspironu s předpokládanou počáteční koncentrací 5 mg/l byly za sterilních podmínek odebírány vzorky (přibližně 0,5 ml) z baněk v časových intervalech 0, 24, 48, 72 a 96 hodin od začátku experimentu. Odebrané vzorky byly uloženy v mrazicím boxu pro následnou analýzu pomocí HPLC.

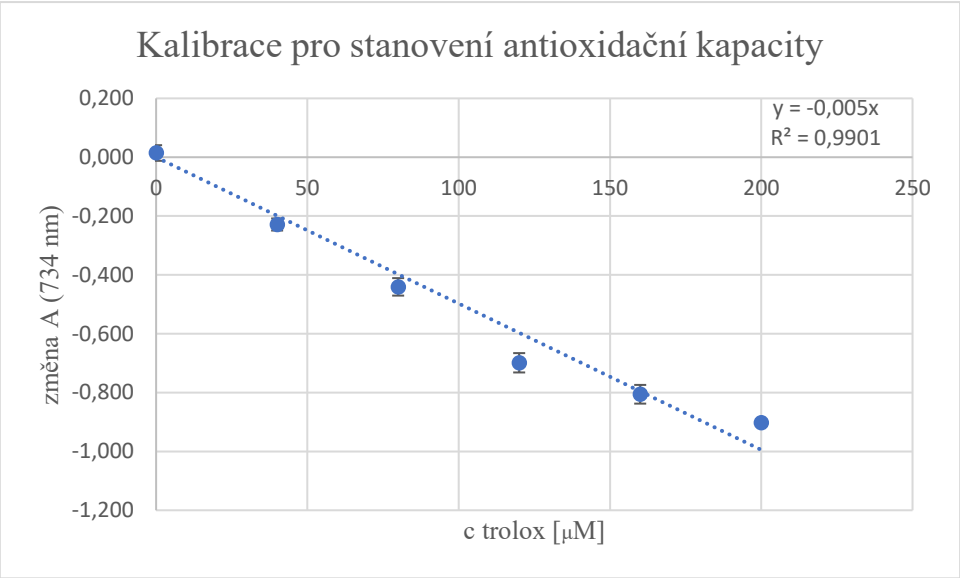
7.4.3. Analýza HPLC

HPLC je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která byla využita k určení aktuálních koncentrací fytoextrakci trazodonu, escitalopramu a buspironu v průběhu kultivace. K přípravě mobilní fázi byl použit acetonitril. Pro analýzu medií s obsahem trazodonu byla použita mobilní fáze acetonitril/voda (25/75, v/v) se 100 µl kyseliny fosforečné, průtok 1 ml/min. UV detekce byla prováděna při 247 nm. Pro escitalopram byla připravena mobilní fáze jako směs acetonitrilu a vody v poměru 3:7 (v/v) s přídavkem 100 µl kyseliny fosforečné na 1l mobilní fáze. Analýza probíhal při vlnové délce 239 nm a za průtoku 1 ml/min. Analýza buspironu musela být provedena gradientovou elucí při vlnové délce 240 nm a průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Gradient byl realizován z roztoku A (15% acetonitrilu ve vodě + 0,01% kyseliny fosforečné) a roztoku B (40% acetonitrilu ve vodě + 0,01% kyseliny fosforečné) s průběhem 0-2,5 min 100%A, 2,5 – 6 min 0 % - 100 % B, 6 – min 100 %B, 8 – 10 min 100%B – 100% A, 10 – 11 min 100% A.

7.5. Biochemická analýza

7.5.1. Stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS

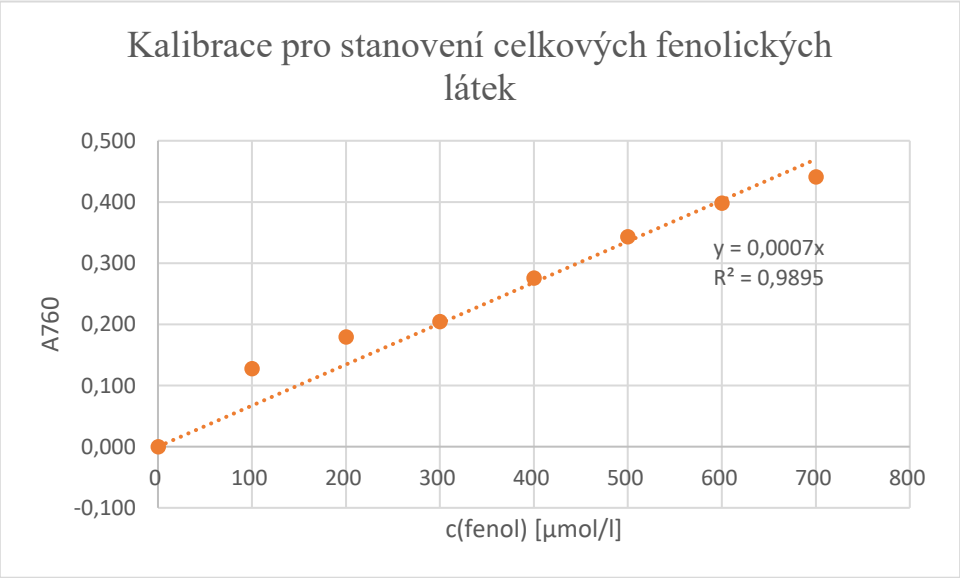
Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 30 µl vhodně zředěného 1mM troloxu připraveného v 50 % ethanolu a cca 110 mmol · L^{-1} roztoku kationradikálu ABTS. Následně do reference bylo místo vhodně zředěného troloxu pipetováno 30 µl destilované vody. Destička byla inkubována po donu 10 minut a následně byla změřená absorbance při vlnové délce 734 nm (viz. Graf č. 1). Vlastní stanovení probíhalo náhradou troloxu za vhodně zředěný rostlinný extrakt, který byl připraven rozdrcením listů a kořenů v 50% ethanolu.



Graf 1: Kalibrační závislost rozdílu absorbance standardu oproti referenci na koncentraci troloxu při vlnové délce 734 nm.

7.5.2. Stanovení fenolických látek

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 µl vhodně zředěného 2mM fenolu připraveného v 50 % ethanolu, následně bylo přidáno 100 µl 10% (v/v) Folinového činidla. Po 4 minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo poté přidáno 80 µl 75 g/l Na_2CO_3 a mikrotitrační destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 760 nm (viz. Graf č. 2). Vlastní stanovení probíhalo náhradou troloxu za vhodně zředěný rostlinný extrakt.

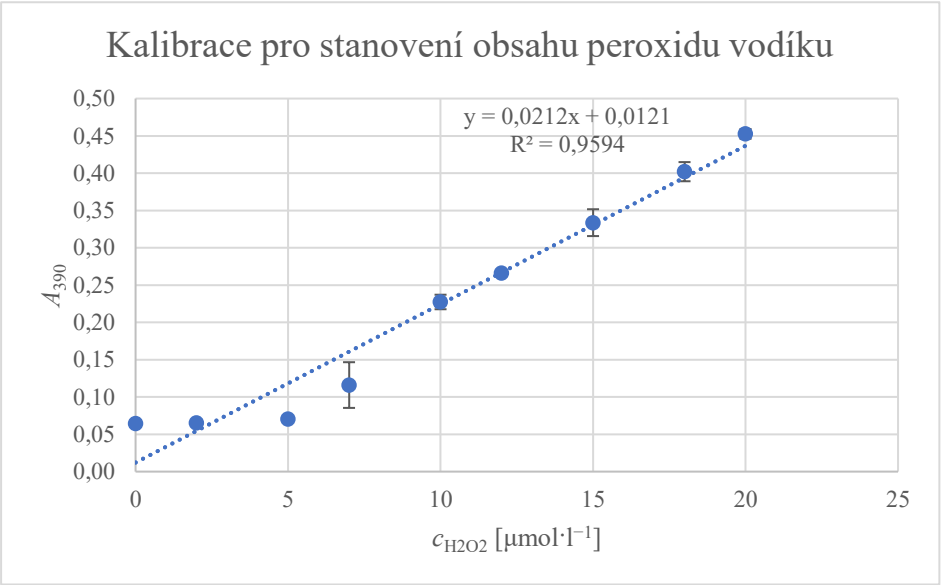


Graf 2: Kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 760 nm na koncentraci fenolu.

7.5.3. Stanovení obsahu peroxidu vodíku

Vzorky listů a kořenů byly homogenizované v 0,1 % kyselině trichloroctové (TCA), následně byly centrifugovány po dobu 10 minut, 13400 RPM N stolní centrifuze (MiniSpin Eppendorf) za vzniku supernatantu. Do mikrotitrační destičky bylo odpipetováno 100 µl 1M KI, následně bylo přidáno 50 µl 10 mM fosfátového pufru, pH = 7,0 a 50 µl získaného supernatantu.

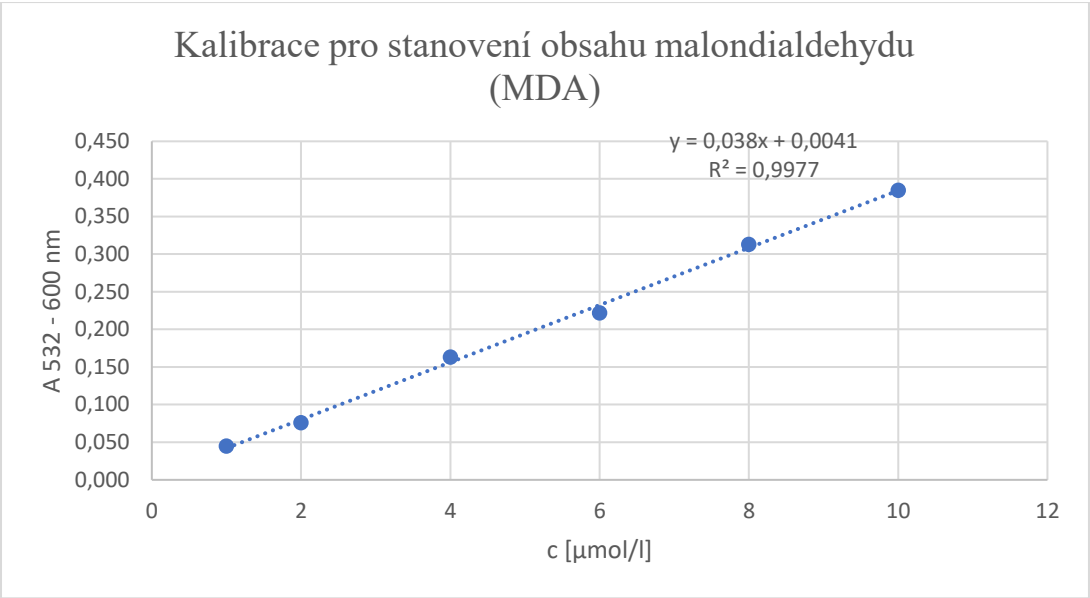
Směs byla nechaná po dobu 30 min inkubovat ve tmě za laboratorní teploty a poté byla následně změřena absorbance při 390 nm (viz Graf č. 3). Kalibrace byla provedena pomocí roztoků H_2O_2 v rozsahu 0-20 µM.



Graf 3: Kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 390 nm na koncentraci peroxidu vodíku.

7.5.4. Stanovení obsahu malondialdehydu

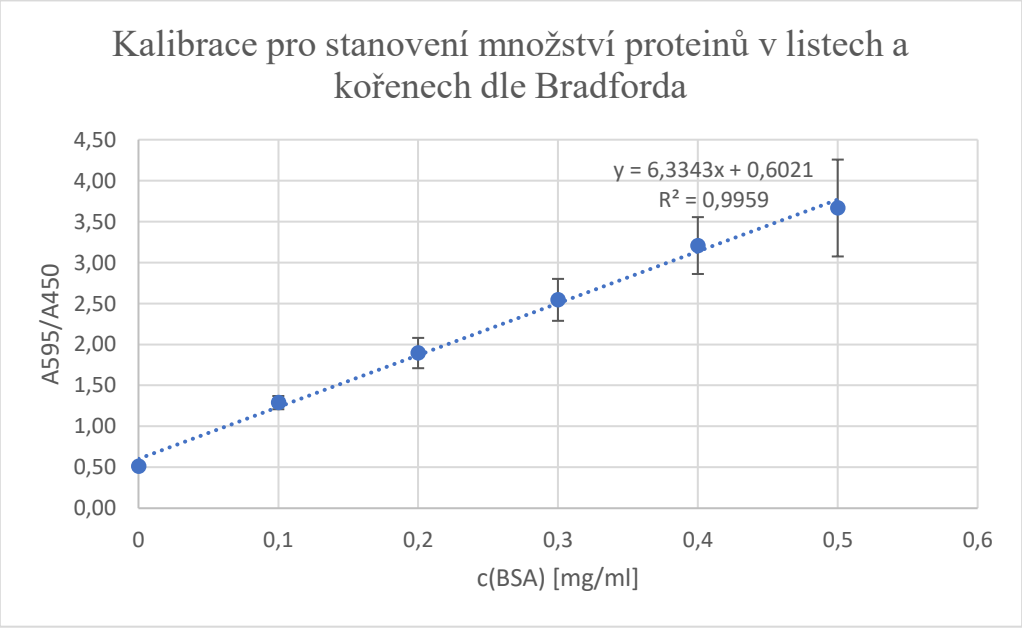
Za účelem stanovení obsahu malondialdehydu (MDA) byly připraveny roztoky MDA v rozsahu koncentrací 1-10 µmol/l, které byly použity pro přípravu kalibrační řady. Do mikrozkumavky bylo odpipetováno 50 µl vhodně zředěného MDA připraveného v 50 % ethanolu, následně bylo přidáno 100 µl 20% TCA a 100 µl 0,67% kyseliny thiobarbiturové (TBA). Mikrozkumavky byly zahřívány při 95° po dobu 15 minu a následně ponořeny do ledu pro rychlému zastavení reakce. Poté byla změřena absorbance pří vlnové délce 532–600 nm (viz Graf č. 4). Vlastní stanovení probíhalo náhradou roztoku MDA za vhodně zředěný rostlinný extrakt. připravený stejným způsobem jako pro stanovení peroxidu vodíku (viz kapitola 7.5.3)



Graf 4: Kalibrační závislost absorbance při vlnové délce v rozmezí 534-600 nm na koncentraci MDA.

7.5.5. Stanovení množství proteinů v listech a kořenech dle Bradforda

Množství proteinů bylo stanoveno ve všech připravených rostlinných extraktech. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 µl vhodně zředěného rostlinného extraktu a 200 µl Bradfordova činidla. Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě, poté byla změřena absorbance při 595 nm a 450 nm. Kalibrace byla provedena pomocí měření roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentracích od 0,1 do 0,5 mg/ml (viz Graf č. 5)



Graf 5: Kalibrační závislost poměru absorbance při vlnové délce 594 a 450 nm na koncentraci BSA.

7.5.6. Stanovení množství proteinů v kultivačním médiu pomocí kyseliny bicinchoninové

Pro stanovení proteinů touto metodou byly připraveny následující roztoky:

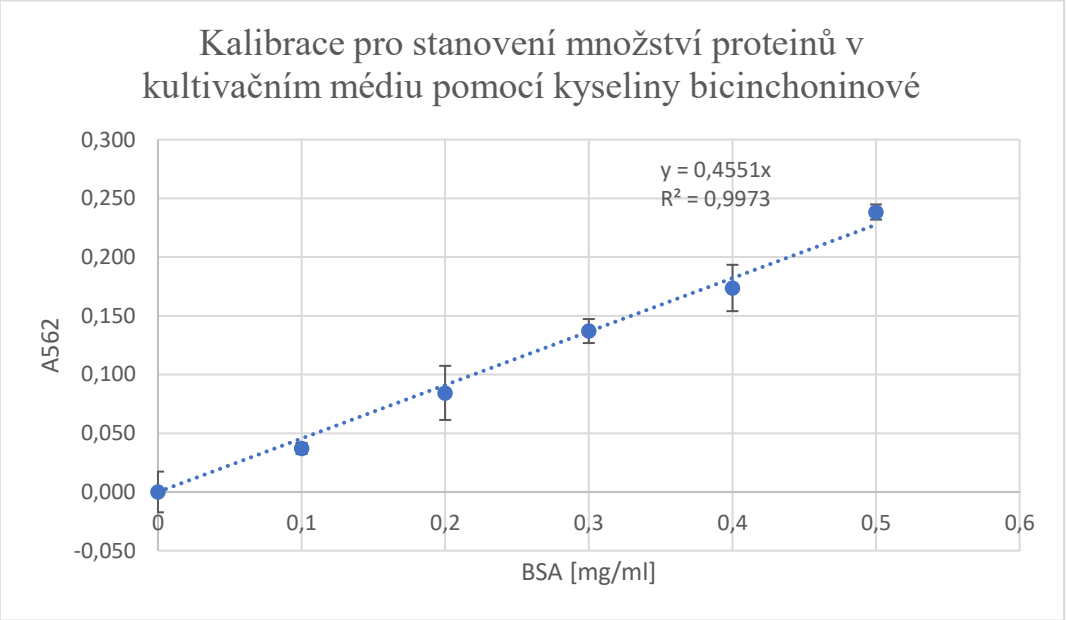
Roztok A: 2% (w/v) Na_2CO_3; 0,95% (w/v) $NaHCO_3$; 0,16% (w/v) vínan sodný; 0,4% (w/v) NaOH; 1% (w/v) sodná sůl kyseliny bicinchoninové (BCA); pH 11,25

Roztok B: 4% (w/v) $CuSO_4 \cdot 5\ H2O$

Činidlo pro stanovení proteinů bylo připraveno smícháním roztoků A a B v poměru 50:1.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno po deseti mikrolitrech standardních roztoků BSA vždy v triplikátech. Do dalších volných sloupků byly pipetovány rovněž v triplikátech stanovované vzorky kultivačního média.

Poté do každé jamky bylo pipetováno 200 µl připraveného činidla pro stanovení koncentrace proteinů. Poté destička byla inkubována po dobu 60 min při 37°C. Po skončení inkubace byla změřena absorbance při 562 nm (viz Graf č. 6)



Graf 6: Kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 562 nm na koncentraci BSA.

7.5.7. Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymových aktivit

Listy a kořeny byly pomocí kapalného dusíku homogenizovány ve třecí misce. Poté byl k této směsi přidán extrakční pufr s následujícím složením: 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,8; 1 mM DDT; 1 mM Na_2EDTA a 10 mM askorbát sodný. K listům bylo přidáno čtyřnásobné

množství pufru a ke kořenům třínásobné. Následně bylo ke směsi přidáno 4 mg/ml PVP a směs byla centrifugována při 16 000 g a 4 °C po dobu 15 minut. Výsledný supernatant sloužil jako rostlinný extrakt pro stanovení obsahu proteinů a enzymových aktivit.

7.6. Nativní elektroforéza

Elektroforéza je laboratorní technika používaná k separaci molekul na základě jejich velikosti a náboje. Molekuly, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny, jsou umístěny do gelu a poté vystaveny elektrickému poli. V závislosti na svých fyzikálních vlastnostech, jako je velikost, tvar a elektrický náboj, se pohybují skrz gel různou rychlostí. Tato metoda umožňuje oddělení a analýzu jednotlivých složek ve směsi, což je užitečné pro identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci biomolekul. Při nativní elektroforéze jsou molekuly analyzovány ve svém přirozeném, nezměněném stavu, což umožňuje studium jejich přirozené struktury a funkce.

7.6.1. Postup přípravy gelu pro elektroforézu

Směs pro přípravu 4 gelů soupravy Mini-Protean (Bio-Rad, USA) byla připravena podle Tabulky 1 pro přípravu 10% polyakrylamidového separačního gelu pro nativní elektroforézu.

složka	**objem [ml]**
H_2O	7,9
30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5:1)	6,7
TEMED	0,002
10% (w/v) roztoku glycerolu	0,2
1,5M Tris-HCl pufru (pH 8,8)	5,0

Tabulka 1: Směs pro přípravu 10% separačního gelu.

Ke směsi připravené podle Tabulky 5 bylo přidáno 200 µl 10% peroxodisíranu amonného, aby došlo k polymeraci gelu. Poté byla tato směs nalita mezi skla pro elektroforézu a překryta destilovanou vodou. Při laboratorní teplotě probíhala polymerizace gelu 30 minut.

Pro dokončení polymerizace byly gely pokryty 4% zaostřovacím gelem. Podle Tabulky 2 byla připravena směs pro přípravu vodného množství 4% zaostřovacího gelu.

složka	**objem [ml]**
H_2O	1,2
30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5:1)	0,26
TEMED	0,005
10% (w/v) roztoku glycerolu	0,02
1,5M Tris-HCl pufru (pH 8,8)	0,5

Tabulka 2: Směs pro přípravu 4% zaostřovacího gelu.

Po smíchání směsi dle Tabulky 6 bylo ke směsi přidáno 20 µl 10% peroxodisíranu amonného. Pomocí plastové šablony byly mezi skly pro elektroforézu vytvořeny jamky pro pipetování vzorků.

7.6.2. Průběh elektroforézy

Stejným způsobem jako pro stanovení enzymových aktivit byl připraven i rostlinný materiál. K extraktu byla navíc přidána sacharóza, aby její výsledná koncentrace byla 20% (w/v). Do jednotlivých jamek v gelu bylo přidáno takové množství vzorku, aby ve všech jamkách bylo stejné množství proteinů, stanovené 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 litru destilovanou vodou. Do horní části elektroforetické aparatury do elektroforetického pufru bylo rovnoměrně přidáno 100 µL 0,1% (w/v) bromfenolové modři.

Pro separaci byly elektroforetické gely umístěny do elektroforetického přístroje a naplněny běhovým pufrem obsahujícím Tris-glycin. Elektroforéza probíhala nejdříve po dobu cca 15 min při 70 V a jakmile bromfenolová modř doputovala k separačnímu gelu, bylo napětí zvýšeno na 180 V. Celkově elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hodiny. Po ukončení elektroforézy byly gely obarveny vhodnými detekčními směsmi pro stanovení enzymových aktivit. Tyto směsi obvykle obsahují substráty specifické pro jednotlivé enzymy, pufr o vhodném pH a chromogenní nebo fluorogenní indikátor, který reaguje na aktivitu enzymu a umožňuje vizualizaci výsledků. Detekční směsi byly aplikovány na gely a inkubovány při optimálních podmínkách (např. teplota a čas) potřebných pro dané enzymové reakce.

7.6.3. Detekce aktivity a isoforem enzymů v gelu

Pro detekci aktivity a izoforem enzymů v gelu byla použita specifická barvicí metoda, která umožňuje vizualizaci enzymové aktivity přímo v gelu po elektroforéze. Po ukončení elektroforézy byly gely inkubovány ve vhodném detekčním pufru, který obsahoval specifické substráty pro dané enzymy. Detekční pufr také obsahoval barvivo, které reaguje s produktem enzymové reakce a vytváří viditelné pásy na gelu.

7.6.4. Celkové peroxidasy

Pro stanovení peroxidáz ve vzorcích byl gel ponořen do roztoku připraveného nasledovně: 0,01 g DAB bylo rozpuštěno v 2,5 ml 96% ethanolu, poté bylo přidáno 7 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 7,0) a 100 µl 30% H_2O_2. Roztok byl následně doplněn destilovanou vodou na celkový objem 10 ml a krátce sonikován. Gel byl ponechán v tomto roztoku, dokud nedosáhl požadovaného vybarvení, a poté byl přenesen do destilované vody.

7.6.5. Glutathion-S-transferasa

Pro specifickou detekci GST byl gel po elektroforéze nejdřív inkubován po dobu 10 minut při 37 °C v roztoku o celkovém objemu 10 ml. Tento roztok obsahoval 100 mM fosfátový pufr (pH 6,5), 4,5 mM glutathion (GSH), 1 mM CDNB a 1 mM nitroblue tetrazoliové soli (NTB). Po inkubaci byl gel promyt a umístěn do druhého roztoku, kde byl ponechán při laboratorní teplotě, dokud nedosáhl požadovaného zbarvení. Druhý roztok obsahoval 100 mM Tris-HCl (pH 9,6) a 3 mM PMS. Poté byl gel několikrát promyt vodou. Během inkubace docházelo k redukci NBT na nerozpustný formazan, přičemž PMS sloužilo jako zdroj elektronů. Zbarvené byly části gelu, kde neproběhla reakce a GST se zde nenacházela. Tato metoda byla převzata z [70].

7.6.6. Glutathionperoxidasa

Gel byl po elektroforéze dvakrát promyt v roztoku 50 mM Tris-HCl (pH 7,9) po dobu 20 minut pro specifickou detekci aktivity glutathionperoxidasy (GPX) v gelu. Poté byl gel inkubován 20 minut v roztoku obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 13 mM glutathion a 0,004% peroxidu vodíku. Následně byl gel krátce promyt vodou a umístěn do tmy na 10 minut do inkubační směsi složené z 1,2 mM MTT a 1,6 mM PMS. Po inkubaci byl gel analyzován. Tmavé oblasti gelu indikují místa, kde neproběhla reakce s GSH katalyzovaná přítomnou GPX, zatímco světlé oblasti ukazují místa, kde reakce katalyzovaná GPX proběhla. Tato metoda byla převzata z [71].

7.6.7. Želatinová zymografie pro stanovení aktivity proteas

Tato metoda je založena na SDS-PAGE s gely obsahujícími želatinu. Po provedení elektroforézy a odstranění SDS proteasy obnoví svou aktivitu, což jim umožňuje štěpit želatinu. Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue pak indikuje místa proteolytické aktivity jako bílé pruhy na tmavém pozadí (Leber a Balkwill 1997).

Rostlinný extrakt byl smíchán v poměru 1:1 s neredukčním vzorkovým pufrem, který obsahoval 63 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS a 0,0013% (w/v) bromfenolovou modř. Vzorky byly poté inkubovány hodinu při 37 °C za stálého míchání na orbitálním třepači s rychlostí 900 otáček za minutu. Následně byly vzorky naneseny do gelu, přičemž gely i elektrodový pufr obsahovaly SDS místo glycerolu (viz. Kapitola 7.6.1.), přičemž elektroforetická separace probíhala při teplotě 4 °C.

Po vyjmutí gelů ze skleněných desek byly krátce promyty v destilované vodě. Poté byly gely ponořeny do 2,5% (v/v) Tritonu X-100 na 1 hodinu. Gely byly dvakrát rychle opláchnuty v inkubačním roztoku, ve kterém byly následně inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Složení tohoto roztoku bylo: 50 mM Tris-HCl (pH 8,4) a 5 mM chloridu vápenatého. Po inkubačním období a dvou krátkých opláchnutích v destilované vodě byly gely barveny v roztoku Coomassie Brilliant Blue (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 40% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyselině octové) po dobu 2 hodin. Gely byly následně inkubovány v odbarvovacím roztoku (10% (v/v) kyselina octová ve 25% (v/v) ethanolu) až do objevení bílých pruhů.

7.6.8. Stanovení aktivity volných peroxidas

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 155 µL 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0), 5 µL 30% (v/v) roztoku H_2O_2, 20 µL 4 mg/mL roztoku 3,3´-diaminobenzidinu (DAB) v 96% (v/v) ethanolu a 20 µL rostlinného extraktu. Okamžitě poté byla absorbance kontinuálně měřena při 430 nm po dobu 5 minut za laboratorní teploty [72].

7.6.9. Stanovení aktivity fosfatas

Aktivita fosfatas byla vyjádřena jako množství uvolněného p-nitrofenolu za vhodný čas na čerstvou hmotnost. Kalibrační závislost absorbance při 405 nm na množství p-nitrofenolu byla lineární o výsledné rovnici přímky:

$A(405\ nm) = 0{,}0393 \times n(nmol\ p\text{-}NF)$, $R^2 = 0{,}9995$.

7.6.9.1. Kyselé fosfatasy

Reakční směs obsahovala 50 mM citrátový pufr (pH 6,0), 0,5 mM *p*-nitrofenylfosfát a 20 µL rostlinného extraktu v celkovém objemu 40 µL. Reakce byla zastavena přidáním 80 µL 0,1 M Tris-HCl (pH 9,0). Hydrolyzovaný p-nitrofenol v alkalickém prostředí byl kvantifikován měřením absorbance při 405 nm proti slepému vzorku, ve kterém byl enzym předem inaktivován vysokým pH borátového pufru

7.6.9.2. Alkalické fosfatasy

Reakční směs obsahovala 50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,5 mM *p*-nitrofenylfosfát a 20 µL rostlinného extraktu v celkovém objemu 100 µL. Reakce byla kontinuálně měřena při 405 nm a 25 °C [73].

7.6.10. Stanovení aktivity β-glukosidasy

Reakční směs se skládala z 50 mM citrátového pufru (pH 6,0), 0,5 mM p-NP-β,D-glukopyranosidu a 20 µL rostlinného extraktu, čímž byl dosažen celkový objem 40 µL. Reakce byla zastavena přidáním 80 µL 0,1 M Tris-HCl (pH 9,0). Hydrolyzovaný p-nitrofenol v alkalickém prostředí byl kvantifikován měřením absorbance při 405 nm proti slepému vzorku, kde byl enzym předem inaktivován vysokým pH borátového pufru [73]. Aktivita β-glukosidasy byla vyjádřena pomocí stejné kalibrační závislosti jako aktivita fosfatas (viz kapitola 7.6.9).

7.7. Imunochemická analýza

K přípravě rostlinných extraktů pro elektroforetickou separaci v prostředí SDS byly použity listy a kořeny. Rostlinné extrakty byly smíseny v poměru 1:1 se vzorkovým redukčním pufrem, který obsahoval 0,13M Tris-HCl pufr o pH 6,8, 0,2 g/ml glycerolu, 3% (w/v) SDS, DTT a 0,05% (w/v) bromfenolovou modř. Vzniklé roztoky byly před aplikací do gelu zahřáty na 100°C po dobu 5 minut a následně ochlazeny na laboratorní teplotu.

Akrylamidový gel pro elektroforézu se skládal z velkopórového 6% zaostřovacího gelu a malopórového 12% separačního gelu. První 12% separační gel byl připraven z 4,9 ml deionizované vody, 6 ml 30% (w/v) akrylamidu/bisakrylamidu, 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (pH 8,8), 150 µl 10% (w/v) SDS, 6 µl TEMED a 150 µl 10% (w/v) peroxodisíranu amonného (APS). Poté byl separační gel překryt 6% zaostřovacím gelem, který se skládal z 2,7 ml deionizované vody, 670 µl 30% (w/v) akrylamidu/bisakrylamidu, 500 µl 0,5 M Tris-HCl pufru (pH 6,8), 40 µl 10% (w/v) SDS, 4 µl TEMED a 40 µl 10% (w/v) APS.

Po sestavení elektroforetické aparatury, která byla předem odmaštěna etanolem, byly prostory naplněny elektrodovým pufrem složeným z 14,4 g glycinu, 3 g Trisu a 1 g SDS v 1 litru deionizované vody s celkovým pH 8,3. Před aplikací rostlinných extraktů byla koncentrace proteinů určena metodou podle Bradforda a následně upravena tak, aby byla pro každý roztok stejná. Jako standard molekulových hmotností byl použit komerční roztok proteinů Precision Plus Protein Kaleidoscope™ Standards, obsahující proteiny o molekulových hmotnostech 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 a 10 kDa. Napětí bylo nastaveno na 70 V pro zaostřovací gel, a po dosažení bromfenolové modři separačního gelu bylo zvýšeno na 140 V.

Elektroforetickým přenosem, známým jako Western blot, byly proteiny separované v akrylamidovém gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Do zařízení Trans-Blot® Turbo™ pro elektro-přenos bylo podle návodu nejprve vloženo 5 kusů filtračního papíru, na které byla položena nitrocelulózová membrána, následovaná akrylamidovým gelem a dalšími 5 kusy filtračního papíru. Všechny vrstvy byly předem namočeny do transferového pufru s pH 8,3, obsahujícího 25 mM Tris-HCl, 150 mM glycin a 10% (v/v) methanol. Poté byl nastaven standardní 30 minutový elektro-přenos při proudu 1,0 A.

7.7.1. Imunochemické stanovení HSP a chalkonsynthasy

Proteiny oddělené elektroforézou v redukčním prostředí SDS byly z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Na této membráně byly následně proteiny HSP70 a chalkonsynthasy imunochemicky detekovány pomocí specifických protilátek.

Detekce HSP70 a chalkonsynthasy probíhala na principu specifické vazby primárních králičích protilátek na HSP nebo chalkonsynthasu. Pro vizualizaci byla využita sekundární kozí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ALP - E.C. 3.1.3.1). Alkalická fosfatasa katalyzuje odštěpení fosfátové skupiny ze substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indoylfosfát (BCIP). Výsledný meziprodukt reakce, indoxyl, dimerizuje v alkalickém prostředí a jako vedlejší produkt reakce vzniká hydridový ion, který redukuje nitroblue tetrazolium chlorid (NBT), čímž se tvoří barevná sraženina diformazanu.

Po elektroforetickém přenosu byla volná místa na membráně blokována 1 hodinu v 1% (w/v) roztoku BSA v PBS + T pufru (pH 7,4), obsahujícím 137 mM NaCl, 8 mM $Na_2HPO4 \cdot 12H_2O$, 15 mM KH_2PO_4, 3,7 mM KCl, 3 mM NaN_3 a 0,05% (w/v) Tween 20 (T). Následně byla membrána třikrát promyta PBS + T pufrem po dobu 5 minut. Poté byla membrána nechána inkubovat přes noc při laboratorní teplotě s primární králičí protilátkou specifickou proti HSP nebo chalkonsynthase, ředěnou dle návodu v poměru od 1:5000 do 1:1000, v konjugačním pufru (pH 7,4), obsahujícím PBS + T pufr, 2% (w/v) PVP a 0,2% (w/v) BSA.

Po navázání primární protilátky byla membrána opět třikrát promyta PBS + T pufrem po dobu 5 minut a následně inkubována v termostatu při 37°C se sekundární kozí protilátkou proti králičímu IgG, konjugovanou s alkalickou fosfatázou, ředěnou 1:10 000 v konjugačním pufru po dobu 4 hodin. Membrána byla opět třikrát promyta PBS + T pufrem, a nakonec inkubována v reakční směsi při laboratorní teplotě, dokud se neobjevily proužky označující detekované proteiny. Reakční směs obsahovala 10 ml substrátového pufru (1M diethanolamin o pH 9,8), 0,2 mg BCIP a 0,3 mg NBT.

8. Výsledky

8.1. Kalibrace HPLC

Pro kalibraci escitalopramu byly připraveny roztoky o koncentracích: 1,25; 2,5; 5,0; 7,5. Byla stanovena hodnota LOD z absolutní hodnoty šumu na 0,04 mg · L^{-1} a LOQ na 0,12 mg · L^{-1} za daných podmínek. Kalibrační přímka odpovídala rovnici y = 3659,5x + 1276,8 s korelační koeficientem 0,9943.

Pro kalibraci buspironu byly připraveny roztoky o koncentracích: 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,0. Byla stanovena hodnota LOD z absolutní hodnoty šumu na 0,02 mg · L^{-1} a LOQ na 0,06 mg · L^{-1} za daných podmínek. Kalibrační přímka definována rovnici y = 7,43393x + 6,56872 s korelační koeficientem 0,992.

Pro kalibraci trazodonu byly připraveny roztoky o koncentracích: 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,0. Byla stanovena hodnota LOD z absolutní hodnoty šumu na 0,0013 mg · L^{-1} a LOQ na 0,044 mg · L^{-1} za daných podmínek. Kalibrační přímka vyjadřuje rovnici y = 2,53685x s korelační koeficientem 0,995.

8.2. Fytoextrakční experimenty

8.2.1. Fytoextrakce escitalopramu

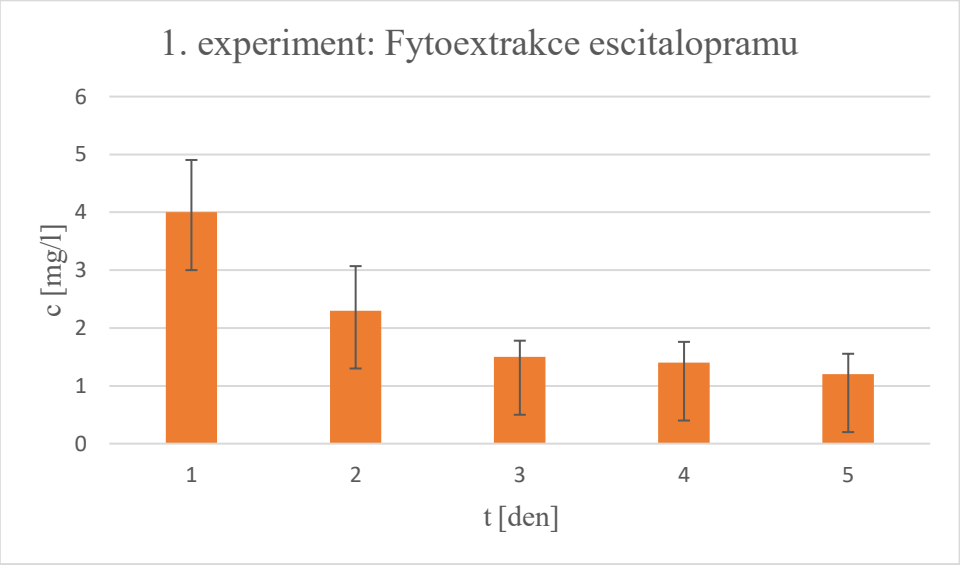
První experiment byl proveden na 6 rostlinách. Původní medium bylo odstraněno a bylo přidáno 100 ml kultivačního media. Následně byl přidán roztok escitalopramu v methanolu tak, aby se dosáhlo počáteční koncentrace xenobiotika 5 mg/l. Vzorky byly odebrány okamžitě po kontaminaci léčivem (den 1) a poté po 24, 48, 72 a 96 hodinách (tj. dny 2-5).

Tabulka 3 znázorňuje získané hodnoty koncentrace escitalopramu. Graf 7 ukazuje závislost průměrných hodnot koncentrace escitalopramu během pětidenního odběru vzorků.

Během pětidenního experimentu došlo k poklesu koncentrace escitalopramu v průměru o 2,8 mg/l, což odpovídá 30 % původní koncentrace a bylo tedy vyextrahováno 70 % léčiva. Průměrná rychlost poklesu koncentrace odpovídá hodnotě 0,06 mg/l/den. Při celkové čerstvé hmotnosti rostlin v experimentu 5,58 g odpovídá průměrná efektivita fytoextrakce 0,05 mg léčiva na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny za dobu kultivace.

Baňka	den 1	den 2	den 3	den 4	den 5
	mg/l				
1	4,60	3,80	1,30	1,00	0,70
2	3,70	2,40	1,40	1,60	1,50
3	3,00	1,90	1,20	1,10	1,00
4	3,00	2,00	1,80	1,40	1,20
5	5,00	2,00	1,90	2,00	1,70
6	4,80	1,70	1,60	1,40	1,20
průměr ± smodch	**4,02±0,83**	**2,30±0,70**	**1,53±0,26**	**1,42±0,33**	**1,22±0,32**

Tabulka 3: Koncentrace escitalopramu v přítomnosti rostliny v experimentech 1 až 6, v závislosti na době od přídavku léčiva, včetně směrodatné odchylky a průměru. Počáteční koncentrace byla 4,02 mg/l.



Graf 7: Průběh poklesu koncentrace escitalopramu v kultivačnímu médiu v závislosti na době odběru vzorků.

Jak je zřejmě z grafu 7 v průběhu experimentu došlo ke poklesu koncentrace ecitalopramu o 2,8 mg/l po 5 dnech odběrů. Výchozí koncentrace escitalopramu měla být 5 mg/l, ale pomocí HPLC byla stanovená reálná průměrná hodnota, která činila 4,02 mg/l. Příčina tohoto rozdílu mohla být způsobeno kvůli okamžité sorpci léčiva na kořeny a vlivem přítomnosti zbytkové vody pod odlití kultivačního média. Koncentrace 4,02 mg/l je považována za výchozí hodnotu, tedy 100 %. Hned druhý den došlo k poklesu koncentrace o 43 %. Během třetího dne došlo k dalšímu poklesu koncentrace o 33 % vzhledem ke dni č. 2. Mezi 3 a 5 dnem byl zaznamenán minimální ubytek léčiva. Celkový pokles koncentrace během fytoextrakčního experimentu byl odvozen z koncentrace v pátém dni kultivace, kdy koncentrace sledovaného léčíva poklesla na 73 % výchozí koncentrace.

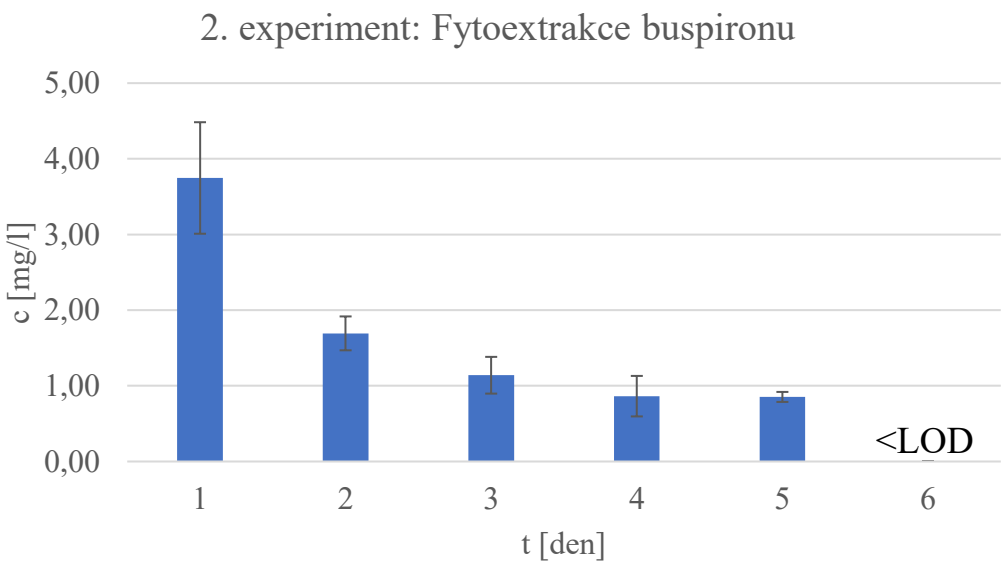
8.2.2. Fytoextrakce buspironu

Naměřené koncentrace xenobiotika v případě buspironu uvádí pro všech 6 kultivací tabulka 4.

Baňka	den 1	den 2	den 3	den 4	den 5	den 6
	mg/l					
1	5,06	1,88	1,62	1,42	<LOD	<LOD
2	4,38	1,54	1,04	0,70	<LOD	<LOD
3	3,50	1,60	1,08	0,62	<LOD	<LOD
4	3,10	1,36	0,82	0,68	0,78	<LOD
5	3,44	1,74	1,20	0,88	0,94	<LOD
6	3,00	2,04	1,08	0,88	0,84	<LOD
průměr ± smodch	**3,75±0,74**	**1,69±0,22**	**1,14±0,24**	**0,86±0,27**	**0,85±0,07**	**<LOD**

Tabulka 4: Koncentrace buspironu v přítomnosti rostliny v experimentech 1 až 6, v závislosti na době od přídavku léčiva, včetně směrodatné odchylky a průměru. Počáteční koncentrace byla 3,75 mg/l.

Během šestidenního experimentu došlo k poklesu koncentrace buspironu v průměru o 2,9 mg/l, což odpovídá 22,7 % původní koncentrace a bylo tedy vyextrahováno 77,3 % léčiva. Průměrná rychlost poklesu koncentrace odpovídá hodnotě 0,058 mg/l/den. Při celkové čerstvé hmotnosti rostlin v experimentu 4,95 g odpovídá průměrná efektivita fytoextrakce 0,056 mg léčiva na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny za dobu kultivace. Naměřené hodnoty v 6 dnu byly pod limitem detekce (viz Graf 8).



Graf 8: Průběh poklesu koncentrace buspironu v kultivačním médiu v závislosti na době odběru vzorků.

Jak je zřejmě z grafu 8 v průběhu experimentu došlo ke poklesu koncentrace buspironu o 2,9 mg/l po 5 dnech odběrů. Jak bylo zmíněno výše 6 odběrový den byl pod limitem detekce. Výchozí koncentrace buspironu měla být 5 mg/l, ale pomocí HPLC byla stanovená reálná průměrná hodnota, která činila 3,75 mg/l. Příčinou tohoto rozdílu mohlo být způsobeno kvůli okamžité sorpcí léčiva na kořeny a vlivem přítomnosti zbytkové vody pod odlití kultivačního média. Koncentrace 3,75 mg/l je považována za výchozí hodnotu, tedy 100 %. Hned druhý den došlo k poklesu koncentrace o 27 %. Ve dni č. 3 došlo k dalšímu poklesu koncentrace o 18 % vzhledem ke 2 dnu a 4 den se koncentrace snížila o dalších 33 % vhledem ke 3 dnu. Mezi 4 a 5 dnem byl zaznamenán minimální ubytek léčiva. Pátý den byl zjištěn celkový pokles koncentrace, který byl stanoven na 76 % oproti výchozí koncentraci.

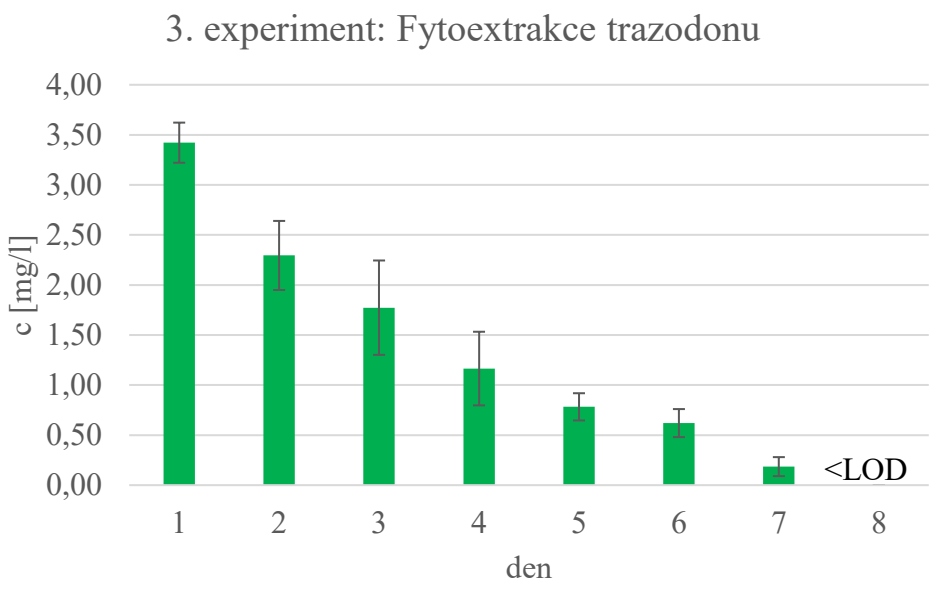
8.2.3. Fytoextrakce trazodonu

Naměřené koncentrace xenobiotika v případě trazodonu uvádí pro všech 8 kultivací tabulka 5.

Baňka	**den 1**	**den 2**	**den 3**	**den 4**	**den 5**	**den 6**	**den 7**	**den 8**
	mg/l							
1	3,58	2,43	1,15	0,99	0,7	0,48	0,09	<LOD
2	3,28	2,07	1,77	1,05	0,99	0,76	0,28	<LOD
3	3,51	2,83	2,61	1,37	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4	3,44	1,74	1,56	0,72	0,63	<LOD	<LOD	<LOD
5	3,66	2,20	1,46	0,99	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	3,06	2,50	2,09	1,87	0,81	<LOD	<LOD	<LOD
průměr ± smodch	**3,42± 0,20**	**2,30± 0,35**	**1,77± 0,47**	**1,17± 0,37**	**0,78± 0,14**	**0,62± 0,14**	**0,19± 0,10**	**<LOD**

Tabulka 5: Koncentrace trazodonu v přítomnosti rostliny v experimentech 1 až 8, v závislosti na době od přídavku léčiva, včetně směrodatné odchylky a průměru. Počáteční koncentrace byla 3,42 mg/l.

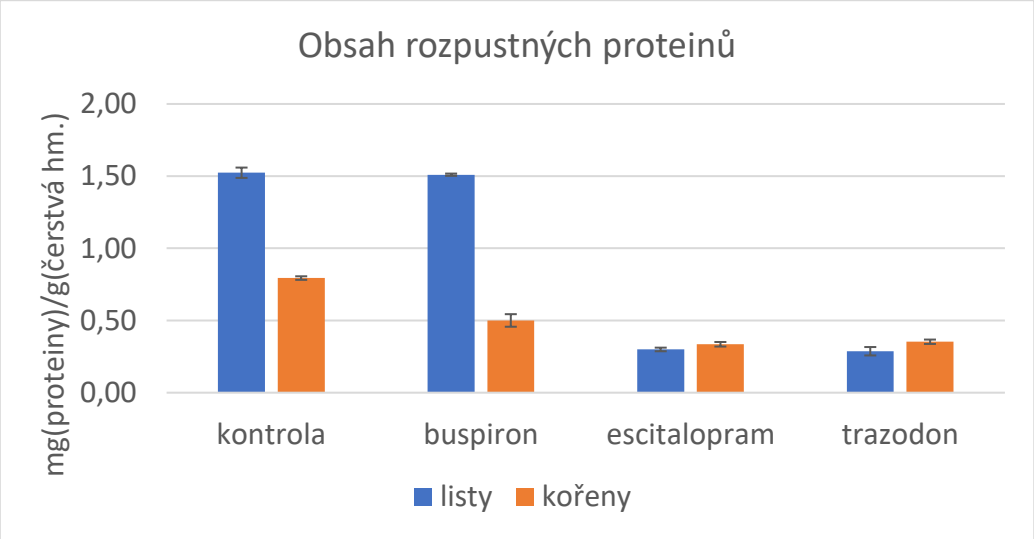
Během osmidenního experimentu došlo k poklesu koncentrace buspironu v průměru o 2,64 mg/l, což odpovídá 22,8 % původní koncentrace a bylo tedy vyextrahováno 77,2 % léčiva. Průměrná rychlost poklesu koncentrace odpovídá hodnotě 0,052 mg/l. Při celkové čerstvé hmotnosti rostlin v experimentu 5,21 g odpovídá průměrná efektivita fytoextrakce 0,05 mg léčiva na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny za dobu kultivace. Naměřené hodnoty v 6-8 den byli pod limitem detekce.



Graf 9: Průběh poklesu koncentrace trazodonu v závislosti na době odběru vzorků.

Jak je zřejmě z grafu 9 v průběhu experimentu došlo ke poklesu koncentrace trazodonu o 2,9 mg/l po 5 dnech odběrů. Jak bylo zmíněno výše 8. den byla jeho koncentrace pod limitem detekce. Výchozí koncentrace trazodonu měla být 5 mg/l, ale pomocí HPLC byla stanovená reálná průměrná hodnota, která činila 3,75 mg/l. Příčina tohoto rozdílu mohla být v okamžité sorpci léčiva na kořeny a vlivem přítomnosti zbytkové vody pod odlití kultivačního média. Koncentrace 3,75 mg/l je považována za výchozí hodnotu, tedy 100 %. Hned druhý den došlo k poklesu koncentrace o 53 %. Ve dni č. 3 došlo k dalšímu poklesu koncentrace o 28 % vzhledem ke dni č.2. Dne č. 4 se koncentrace snížila o dalších 40 % vhledem ke 3 dni. Mezi 4 a 5 dnem byl zaznamenán minimální úbytek léčiva. Pátý den byl zjištěn celkový pokles koncentrace, který byl stanoven na 80 % oproti výchozí koncentraci.

8.3. Biochemická analýza rostlin v listech a kořenech



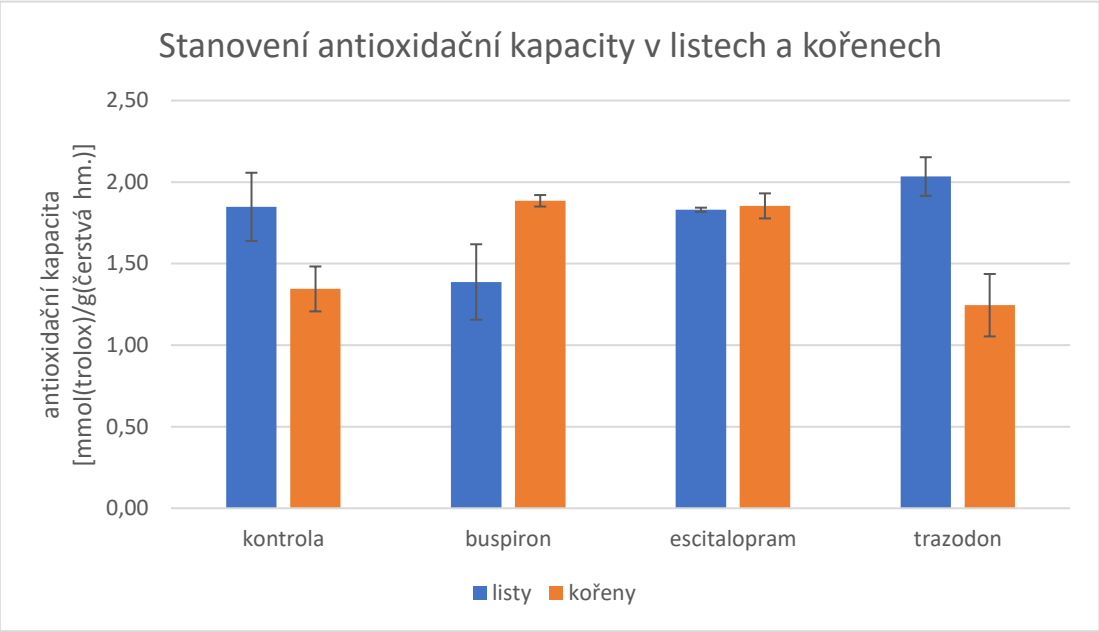
8.3.1. Stanovení množství proteinů

Graf 10: Stanovení množství proteinů dle Bradforda v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*.

Graf č. 10 ukazuje obsah rozpustných proteinů v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: buspiron, escitalopram a trazodon. Kontrolní skupina rostlina neobsahovala žádné léčivo v médiu. V kontrolní skupině je obsah rozpustných proteinů v listech výrazně vyšší než v kořenech. Listy vykazují přibližně dvojnásobný obsah proteinů ve srovnání s kořeny. U rostlin ošetřených buspironem je obsah rozpustných proteinů v listech také výrazně vyšší než v kořenech. V listech je obsah proteinů více než třikrát vyšší než v kořenech. Ve skupině ošetřené escitalopramem je obsah rozpustných proteinů v kořenech mírně vyšší než v listech. U rostlin ošetřených trazodonem je obsah rozpustných proteinů v listech a kořenech téměř vyrovnaný, s nepatrně vyšším obsahem v kořenech.

Celkově graf ukazuje, že v kontrolní skupině a ve skupině ošetřené buspironem je obsah rozpustných proteinů v listech výrazně vyšší než v kořenech. Ve skupině ošetřené escitalopramem je obsah rozpustných proteinů v kořenech mírně vyšší než v listech. U rostlin ošetřených trazodonem je obsah rozpustných proteinů mezi listy a kořeny vyrovnaný. Nejvýraznější rozdíl je patrný u rostlin ošetřených buspironem, kde listy vykazují mnohem vyšší obsah proteinů než kořeny.

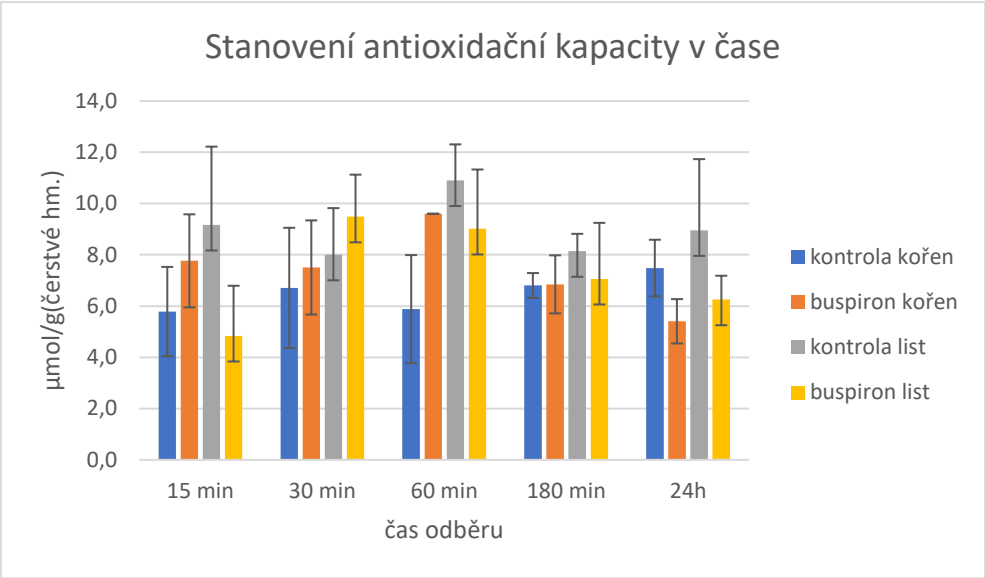
8.3.2. Stanovení antioxidační kapacity



Graf 11: Stanovení antioxidační kapacity v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*.

Z grafu č. 11 je patrné, že antioxidační kapacita v listech a kořenech rostlin se výrazně liší v závislosti na použitém léčivu. Při použití buspironu byla antioxidační kapacita v kořenech přibližně o 12,5 % vyšší než v listech. Listy vykazovaly nižší hodnotu, zatímco kořeny měly vyšší kapacitu. U rostlin ošetřených escitalopramem byla antioxidační kapacita listů o 5 % vyšší než v kořenech. Listy dosahovaly vyšší hodnoty, zatímco kořeny měly mírně nižší kapacitu. Při použití trazodonu byla antioxidační kapacita v listech výrazně vyšší než v kořenech, konkrétně o 25 %. Listy vykazovaly výrazně vyšší hodnotu, zatímco kořeny dosahovaly nižší kapacity.

Celkově lze říci, že rostliny pěstované s buspironem a escitalopramem mají vyrovnanější antioxidační kapacitu mezi listy a kořeny, zatímco rostliny pěstované s trazodonem vykazují výrazně vyšší antioxidační kapacitu v listech než v kořenech.

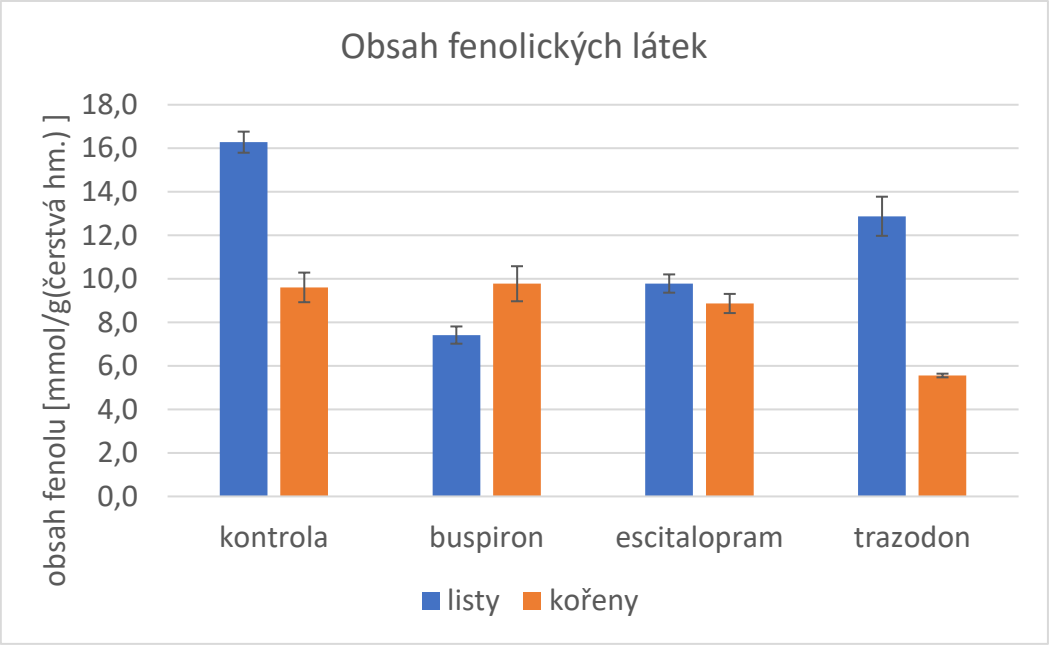


Graf 12: Stanovení antioxidační kapacity v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*. Vyjádření antioxidační kapacity bylo provedeno v ekvivalentech troloxu jako referenční látky.

Z grafu č. 12 je patrné, že antioxidační kapacita v listech a kořenech se mění v závislosti na čase odběru a na přítomnosti buspironu. Po 15 minutách jsou hodnoty antioxidační kapacity u kořenů kontrolní skupiny i skupiny s buspironem relativně nízké, zatímco listy kontrolní skupiny vykazují vyšší kapacitu. Po 30 minutách antioxidační kapacita vzrostla nejvíc v listech buspironu. U listů s buspironem se hodnota zvýšila přibližně o 50 % ve srovnání s 15 minutami, zatímco u kontrolních listů byl nárůst menší o 20 %. Po 60 minutách došlo k výraznému nárůstu antioxidační kapacity u kontrolních listů. U listů kontrolní skupiny se hodnota zvýšila o 30 % oproti 30 minutám, zatímco u listů s buspironem byl menší pokles. Kořeny u kontrolní skupiny vykazovaly snížené hodnoty, s rozdílem přibližně 10 %. Po 180 minutách se antioxidační kapacita začala stabilizovat. U listů kontrolní skupiny došlo k poklesu o 20 % oproti 60 minutám, zatímco listy s buspironem vykazovaly mírný pokles o 10 %. Kořeny v obou skupinách zůstaly relativně stabilní, s mírným průměrným poklesem o 10 %. Po 24 hodinách antioxidační kapacita v listech kontrolní skupiny zůstala téměř stejná jako po 180 minutách, zatímco listy s buspironem vykazovaly pokles o 10 %. Kořeny v kontrolní skupině vykazovaly nárůst o 10 % ve srovnání s 180 minutami, zatímco kořeny s buspironem zaznamenaly mírný pokles.

Celkově lze říci, že antioxidační kapacita se mění v závislosti na čase, přičemž největší nárůst je zaznamenán mezi 15 a 60 minutami, po kterém následuje stabilizace nebo mírný pokles po 180 minutách a 24 hodinách.

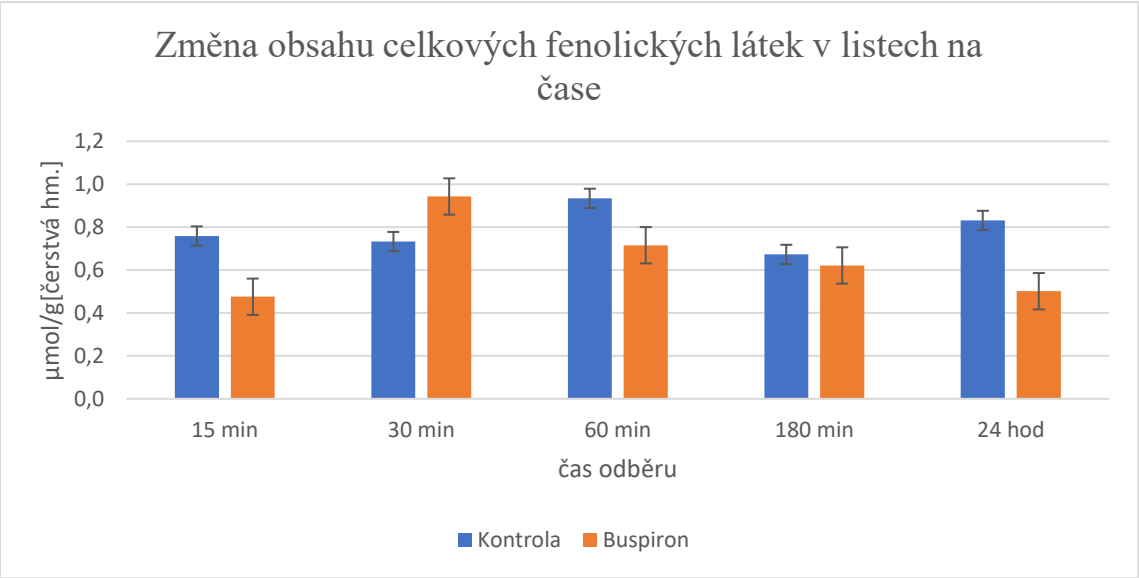
8.3.3. Stanovení fenolických látek



Graf 13: Stanovení obsahu fenolických látek v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*.

Z grafu č. 13 je patrné, že obsah fenolických látek v listech a kořenech rostlin se výrazně liší v závislosti na použitém léčivu. Kontrolní skupina vykazuje nejvyšší obsah fenolických látek v listech, který je přibližně o 50 % vyšší než v kořenech. Při použití buspironu je obsah fenolických látek v listech nižší než v kontrolní skupině. Listy vykazují o 12,5 % vyšší obsah fenolických látek než kořeny. U rostlin ošetřených escitalopramem jsou hodnoty fenolických látek v listech a kořenech téměř vyrovnané. Listy vykazují hodnotu přibližně o 9 % vyšší než u kořenů. Při použití trazodonu je obsah fenolických látek v listech opět vyšší než v kořenech. Listy mají hodnotu přibližně o 60 % více než u kořenů.

Celkově lze říci, že kontrolní skupina a rostliny ošetřené trazodonem vykazují výrazně vyšší obsah fenolických látek v listech než v kořenech, zatímco rostliny ošetřené buspironem a escitalopramem mají vyrovnanější obsah fenolických látek mezi listy a kořeny.



Graf 14: Stanovení fenolických látek v listech kukuřice *Zea Mays*. Celkový obsah fenolických látek je vyjádřen v ekvivalentech fenolu jako referenční látky.

Z grafu č. 14 je zřejmé, že obsah celkových fenolických látek v listech se mění v závislosti na čase odběru a na přítomnosti buspironu. Po 15 minutách je obsah fenolických látek v listech kontrolní skupiny vyšší než u skupiny s buspironem. Po 30 minutách se obsah fenolických látek v kontrolní skupině mírně snížil ve srovnání s 15 minutami, zatímco u listů s buspironem došlo k nárůstu přibližně o 50 %. Po 60 minutách došlo k výraznému nárůstu obsahu fenolických látek pouze v kontrolní skupině, přičemž hodnota se zvýšila přibližně o 14 % oproti 30 minutám. U listů s buspironem se obsah fenolických látek snížil přibližně o 20 % oproti 30 minutám. Po 180 minutách došlo k poklesu obsahu fenolických látek v obou skupinách. U kontrolních listů došlo k poklesu o 12,5 % oproti 60 minutám, zatímco u listů s buspironem byl pokles mírný, přibližně o 10 % oproti 60 minutám. Po 24 hodinách je obsah fenolických látek v kontrolní skupině vyšší než u listů s buspironem. U kontrolních listů se hodnota zvýšila o 14 % oproti 180 minutám, zatímco u listů s buspironem došlo k mírnému poklesu o 10 %.

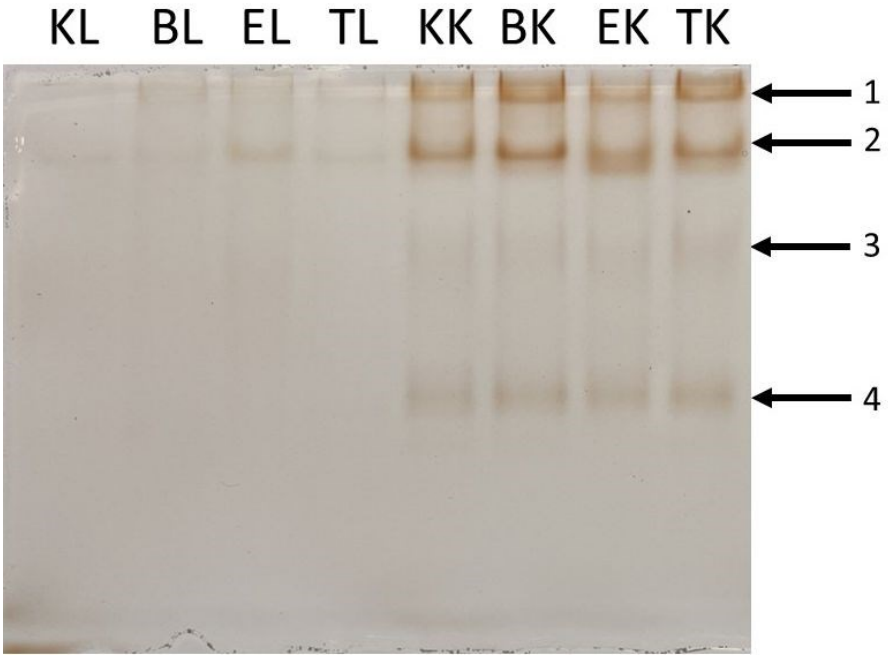
Celkově lze říci, že obsah fenolických látek v listech se mění v závislosti na čase, s výrazným nárůstem mezi 15 a 60 minutami v kontrolní skupině, po kterém následuje pokles po 180 minutách a stabilizace nebo mírný pokles po 24 hodinách. Listy ošetřené buspironem vykazují nižší hodnoty fenolických látek než kontrolní listy v průběhu celého sledovaného časového úseku, s výjimkou 30 minutového vzorku, kde byly hodnoty vyšší.

8.3.4. Detekce malondialdehydu

Detekce malondialdehydu (MDA) byla provedena pomocí specifické chromatografické metody. Ve vzorcích byla detekována pouze kontrolní skupina, kde byla koncentrace MDA jasně měřitelná (9,1 nmol/g(čerstvá hm.)). Ostatní vzorky však byly pod limitem detekce a nebylo tak možné stanovit jejich koncentraci.

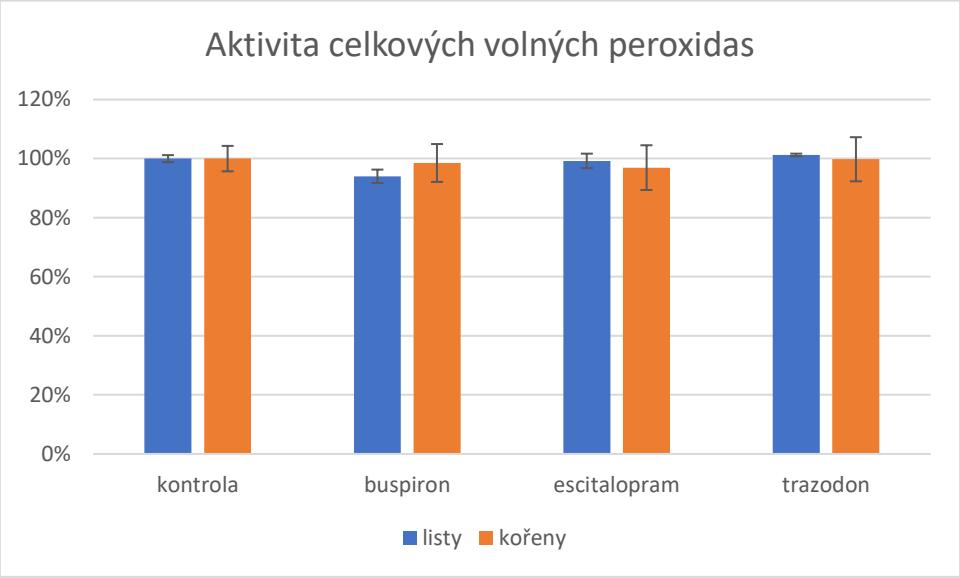
8.3.5. Detekce isoforem a aktivity celkových volných peroxidas

Přítomnost volných peroxidas v extraktech listů a kořenů kukuřice *Zea Mays* byla sledována pomocí nativní elektroforézy. Intenzita jednotlivých pruhů odráží aktivitu enzymu v rostlinách, přičemž počet pruhů odpovídá počtu izoforem daného enzymu. Experimentální výsledky byly znázorněny na elektroforeogramu.



Obrázek 9: Výsledek detekce aktivity volných peroxidas v listech trazodonu (TL), buspironu (BL), escitalopramu (EL), kontroly (KL) a v kořenech trazodonu (TK), buspironu (BK), escitalopramu (EK), kontroly (KK). Jednotlivé šípky označují detekované formy peroxidas.

Z obrázku č. 9 je patrné, že v horní pravé části se vyskytují velmi výrazné pruhy náležící extraktu z kořenů kukuřice *Zea Mays* (označené čísly 1, 2 a 4 na obrázku 9). Při porovnání listů a kořenů podle elektroforeogramu, je zřejmé, že extrakty z kořenů kukuřice pěstovaných v přítomnosti trazodonu, buspironu a ecitalopramu mají vyšší aktivitu jednotlivých isoforem peroxidas než u extraktu z listů pěstovaných v přítomnosti trazodonu, buspironu a ecitalopramu. Intenzity jednotlivých isoforem peroxidas byly vyhodnoceny v programu GelAnalyzer (viz Příloha 1).

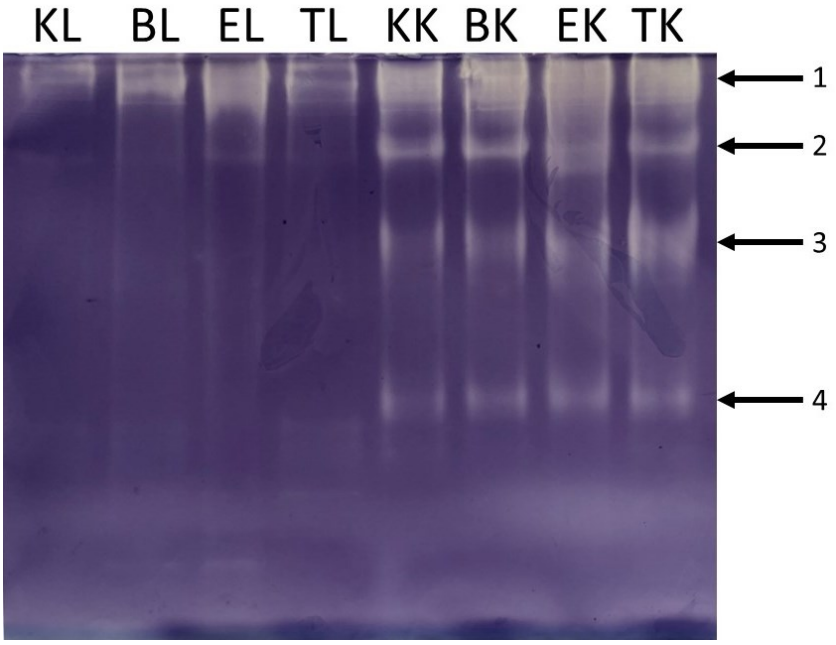


Graf 15: Stanovení obsahu fenolických látek v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*. Aktivita je vždy vztažena k dané kontrolní skupině (tj. listy nebo kořeny).

Aktivita celkových peroxidas byla dále stanovena spektrofotometricky (Graf č. 15), ze kterého je patrné, že aktivita celkových volných peroxidas v listech a kořenech je u všech zkoumaných skupin rostlin velmi podobná a nevykazuje výrazné rozdíly. U kontrolní skupiny je aktivita peroxidas v listech i kořenech téměř shodná, obě hodnoty dosahují přibližně 100 %. Při použití buspironu je aktivita peroxidas v listech mírně nižší než v kořenech, s rozdílem kolem 5 %. U rostlin ošetřených escitalopramem je aktivita peroxidas v listech a kořenech téměř vyrovnaná, s nepatrným rozdílem kolem 2 %. Při použití trazodonu jsou hodnoty aktivity peroxidas v listech a kořenech opět velmi podobné, s rozdílem přibližně 3 %.

Celkově lze říci, že aktivita celkových volných peroxidas je mezi jednotlivými skupinami mezi listy a kořeny velmi konzistentní, bez výrazných rozdílů.

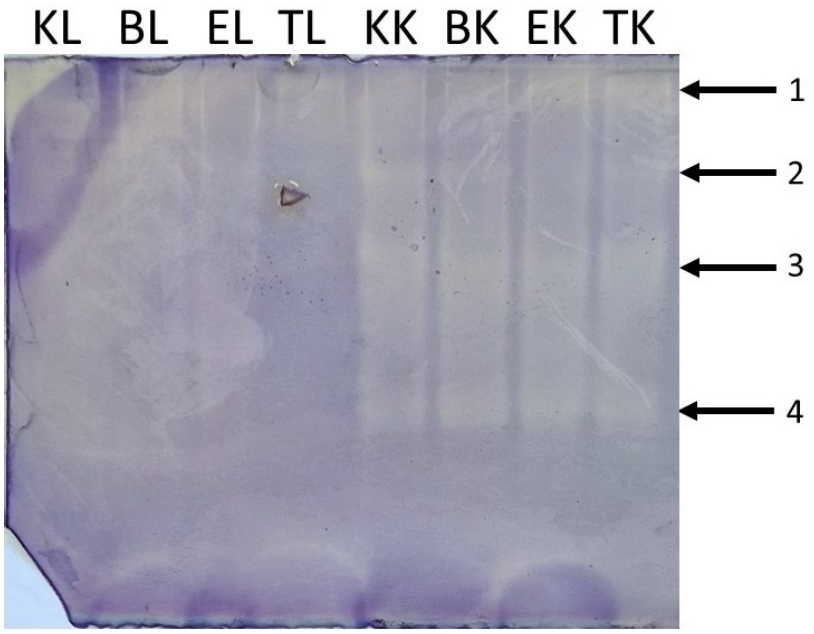
8.3.6. Detekce isoforem a aktivity glutathion-S-transferas



Obrázek 10: Výsledek detekování isoforem GST v listech trazodonu (TL), buspironu (BL), escitalopramu (EL), kontroly (KL) a v kořenech trazodonu (TK), buspironu (BK), escitalopramu (EK), kontroly (KK). Jednotlivé šípky označují detekované isoformy GTS.

Obrázek č. 10 ukazuje výsledky detekce isoforem GTS v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK). Jednotlivé šipky označují detekované isoformy GST. V listech je detekce isoform GST velmi slabá ve všech vzorcích, bez ohledu na použití různých léčiv nebo kontrolní skupiny. V kořenech byly identifikovány čtyři isoformy GST, přičemž nejvyšší intenzitu vykazuje pravděpodobně vzorek s escitalopramem (EK). Kořeny kontrolní skupiny (KK) a ostatních léčiv (TK, BK) vykazují nižší intenzitu isoforem. Intenzity jednotlivých isoforem GST byly vyhodnoceny v programu GelAnalyzer (viz Příloha 2).

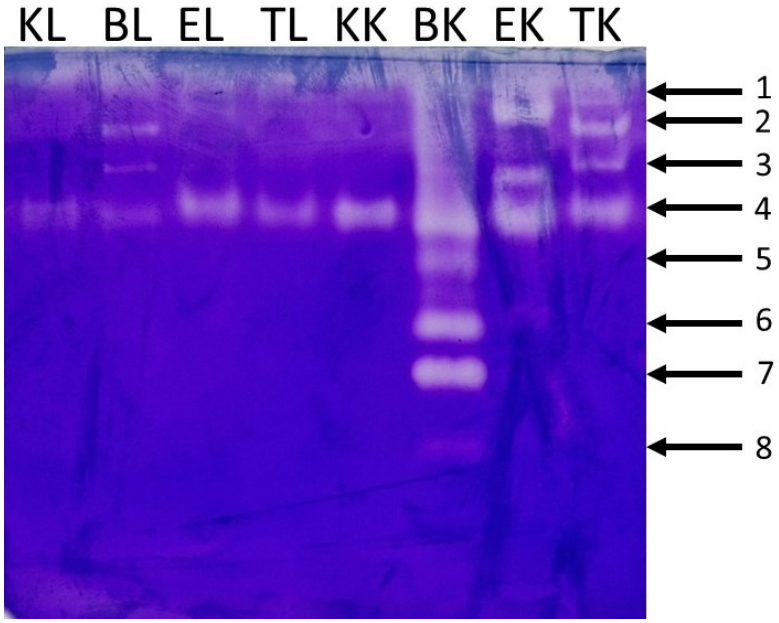
8.3.7. Detekce isoforem a aktivity glutathionperoxidas



Obrázek 11: Výsledek detekování isoform glutathionperoxidasy (GPX) v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK).

Obrázek č. 11 ukazuje výsledky detekce isoform glutathionperoxidasy (GPX) v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK). Jednotlivé šipky označují detekované isoformy GPX. V listech (označené L) všech vzorků (KL, BL, EL, TL) je detekce isoform GPX velmi slabá nebo téměř žádná. V kořenech (označené K) jsou detekovány čtyři isoformy GPX (označené šipkami 1, 2, 3, 4). Nejvyšší intenzita isoforem je patrná u vzorku s escitalopramem (EK). Kořeny kontrolní skupiny (KK) a ostatních léčiv (TK, BK) vykazují nižší intenzitu isoform.

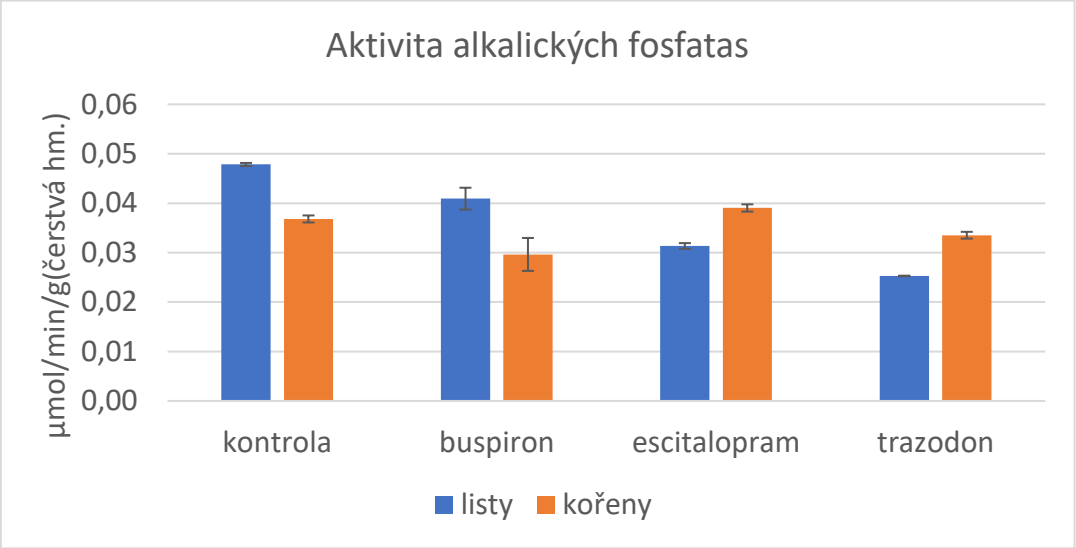
8.3.8. Detekce aktivity proteas



Obrázek 12: Výsledky detekování aktivity proteas v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK).

Obrázek č. 12 ukazuje výsledky detekce aktivity proteas v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK). Jednotlivé šipky označují detekované proteolytickou aktivitu. V listech (označené L) všech vzorků (KL, BL, EL, TL) je detekce aktivity proteas velmi slabá nebo téměř žádná. V kořenech (označené K) je detekována aktivita proteas o různé molekulové hmotnosti (označené šipkami 1 až 8). Nejvyšší intenzita proteolytické aktivity je patrná u vzorku s buspironem (BK). Kořeny kontrolní skupiny (KK) a ostatních léčiv (TK, EK) vykazují různé intenzity proteolytické aktivity. Tyto výsledky naznačují, že aktivita proteas je v kořenech výrazně vyšší než v listech a že buspiron v médiu zřejmě zvyšuje proteolytickou aktivitu intenzitu v kořenech.

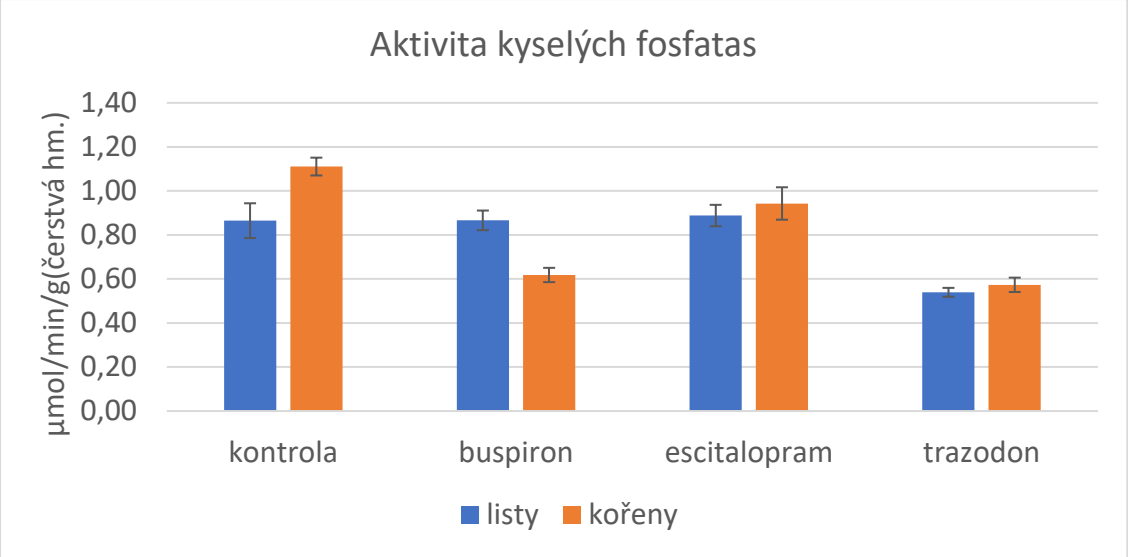
8.3.9. Stanovení aktivity alkalických a kyselých fosfatas



Graf 16: Stanovení aktivity alkalických fosfatas v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*.

Z grafu č. 16 je patrné, že aktivita alkalických fosfatas v listech a kořenech rostlin se liší v závislosti na použitém léčivu. V kontrolní skupině je aktivita alkalických fosfatas v listech vyšší než v kořenech, přičemž listy vykazují hodnotu přibližně o 25 % vyšší než kořeny. U rostlin ošetřených buspironem je aktivita alkalických fosfatas v listech a kořenech téměř vyrovnaná, s mírným převýšením v listech o přibližně 20 %. Aktivita alkalických fosfatas u rostlin ošetřených escitalopramem je vyšší v kořenech než v listech, přičemž kořeny vykazují hodnotu přibližně o 20 % vyšší než listy. U rostlin ošetřených trazodonem je aktivita alkalických fosfatas vyšší v kořenech než v listech, přičemž kořeny mají hodnotu přibližně o 15 % vyšší než listy.

Celkově lze říci, že kontrolní skupina vykazuje nejvyšší aktivitu alkalických fosfatas v listech ve srovnání s ostatními léčivy. U rostlin ošetřených escitalopramem a trazodonem je aktivita alkalických fosfatas vyšší v kořenech než v listech, zatímco u rostlin ošetřených buspironem jsou hodnoty mezi listy a kořeny vzhledem s kontrolní skupinou srovnatelné.

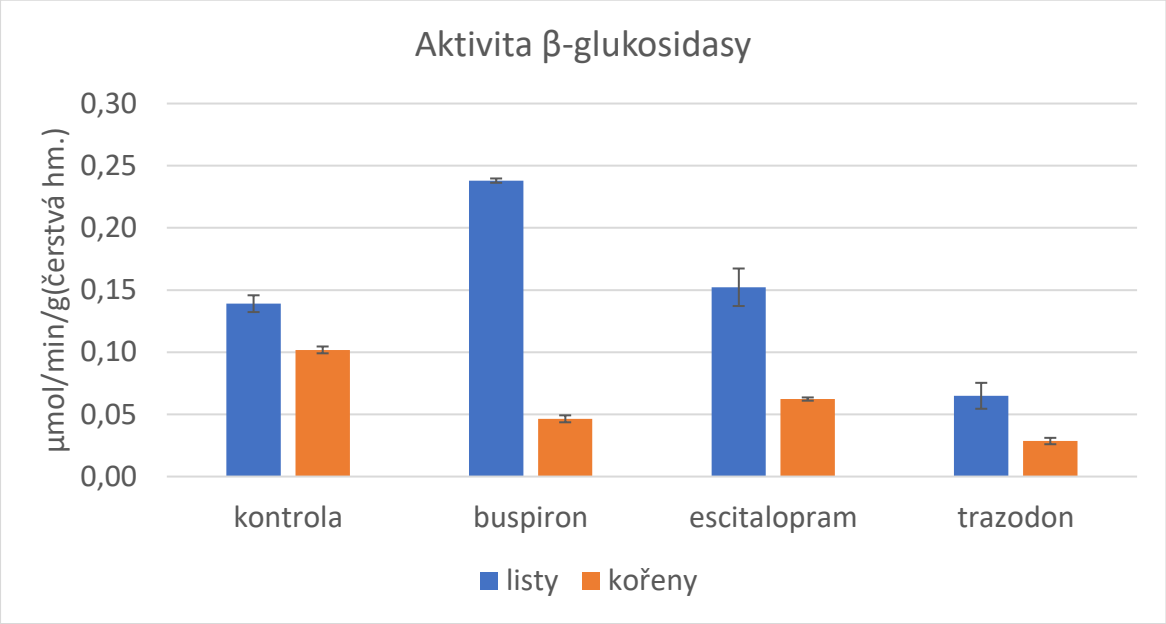


Graf 17: Stanovení aktivity kyselých fosfatas v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*.

Z grafu č. 17 je patrné, že aktivita kyselých fosfatas v listech a kořenech rostlin se liší v závislosti na použitém léčivu. V kontrolní skupině je aktivita kyselých fosfatas v kořenech vyšší než v listech, přičemž kořeny vykazují hodnotu přibližně o 25 % vyšší než listy. U rostlin ošetřených buspironem je aktivita kyselých fosfatas v kořenech nižší než v listech, s rozdílem přibližně 20 %. Aktivita kyselých fosfatas u rostlin ošetřených escitalopramem je v kořenech a listech téměř vyrovnaná, s nepatrným rozdílem kolem 5 %. U rostlin ošetřených trazodonem je aktivita kyselých fosfatas v listech a kořenech vyrovnaná, s velmi malým rozdílem.

Celkově lze říci, že kontrolní skupina vykazuje vyšší aktivitu kyselých fosfatas v kořenech než v listech, zatímco rostliny ošetřené buspironem vykazují vyšší aktivitu v listech než v kořenech. U rostlin ošetřených escitalopramem je aktivita kyselých fosfatas mezi kořeny a listy vyrovnaná, zatímco u rostlin ošetřených trazodonem jsou hodnoty mezi listy a kořeny téměř stejné.

8.3.10. Stanovení aktivity β-glukosidasy



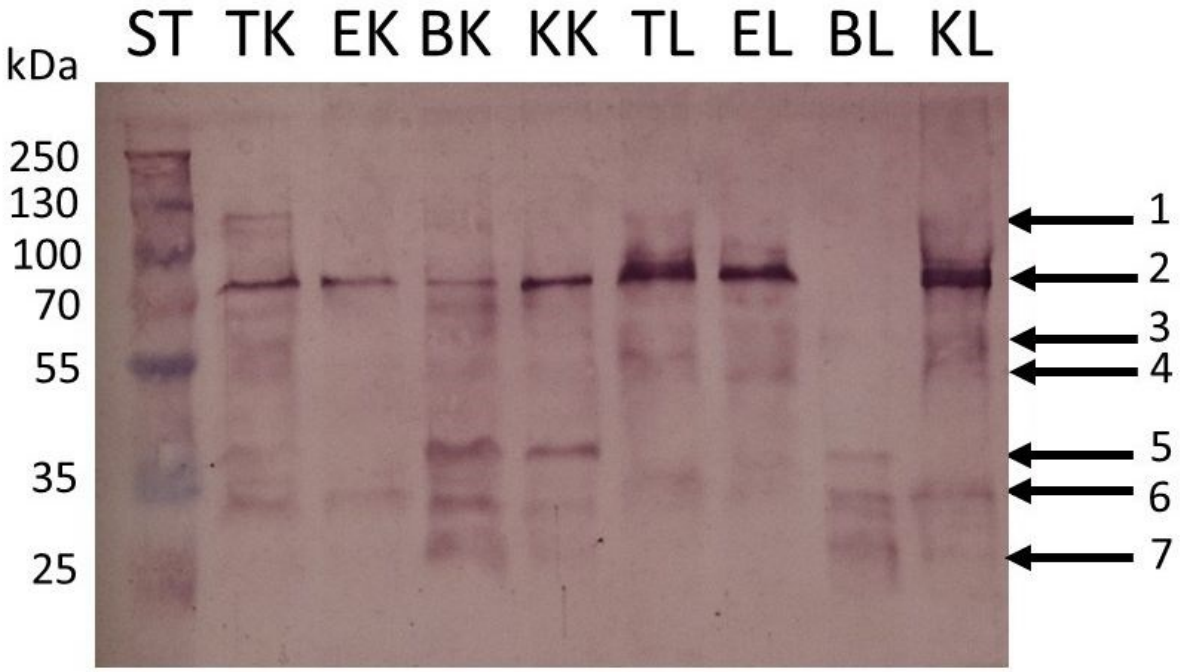
Graf 18: Stanovení aktivity kyselých fosfatas v kořenech a listech kukuřice *Zea Mays*.

Z grafu č. 18 je patrné, že aktivita β-glukosidasy v listech a kořenech rostlin se liší v závislosti na použitém léčivu. V kontrolní skupině je aktivita β-glukosidasy v listech vyšší než v kořenech, přičemž listy vykazují hodnotu přibližně o 20 % vyšší než kořeny. U rostlin ošetřených buspironem je aktivita β-glukosidasy v listech výrazně vyšší než v kořenech, s rozdílem přibližně 500 %, tedy listy vykazují pětkrát vyšší hodnotu než kořeny. Aktivita β-glukosidasy u rostlin ošetřených escitalopramem je také vyšší v listech než v kořenech, přičemž listy vykazují hodnotu přibližně o 100 % vyšší než kořeny. U rostlin ošetřených trazodonem je aktivita β-glukosidasy v listech vyšší než v kořenech, s rozdílem přibližně 50 %.

Celkově lze říci, že listy vykazují vyšší aktivitu β-glukosidasy ve srovnání s kořeny u všech zkoumaných skupin. Nejvýraznější rozdíl je patrný u rostlin ošetřených buspironem, kde je aktivita β-glukosidasy v listech výrazně vyšší než v kořenech. U ostatních skupin je také pozorován vyšší obsah aktivity v listech, přičemž rozdíly mezi listy a kořeny jsou menší.

8.4. Imunochemická analýza

8.4.1. Detekce cytosolové formy HSP70 v listech a kořenech



Obrázek 13: Výsledky detekce cytosolové formy HSP70 v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK).

Obrázek č. 13 ukazuje výsledky detekce cytosolové formy HSP70 v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK). ST označuje barevný proteinový standard, který slouží k analýze molekulové hmotnosti proteinů. Jednotlivé šipky označují detekované proteiny HSP70.

V listech a kořenech ošetřených trazodonem (TL, TK) je detekce HSP70 podobná, s výjimkou pásu označeného šipkou 2, který je výraznější v listech (TL) než v kořenech (TK). U rostlin ošetřených escitalopramem (EL, EK) je v listech (EL) detekce HSP70 výraznější než v kořenech (EK). U rostlin ošetřených buspironem je detekce HSP70 v listech (BL) velmi slabá, s viditelností především v pásmech 5, 6 a 7, zatímco v kořenech (BK) je viditelná v pásmech 2 až 7. V kontrolní skupině jsou v listech (KL) nejvíce viditelné pásy 2 a 6, zatímco v kořenech (KK) jsou nejvíce viditelné pásy 2 a 5.

Celkově výsledky naznačují, že HSP70 je přítomen jak v listech, tak v kořenech, ale množství proteinu (intenzita detekce) se liší v závislosti na vzorku a dané molekulové hmotnosti.

8.4.2. Detekce chalkonsynthasy v listech a kořenech

Obrázek 14: Výsledky detekce chalkonsynthasy v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK).

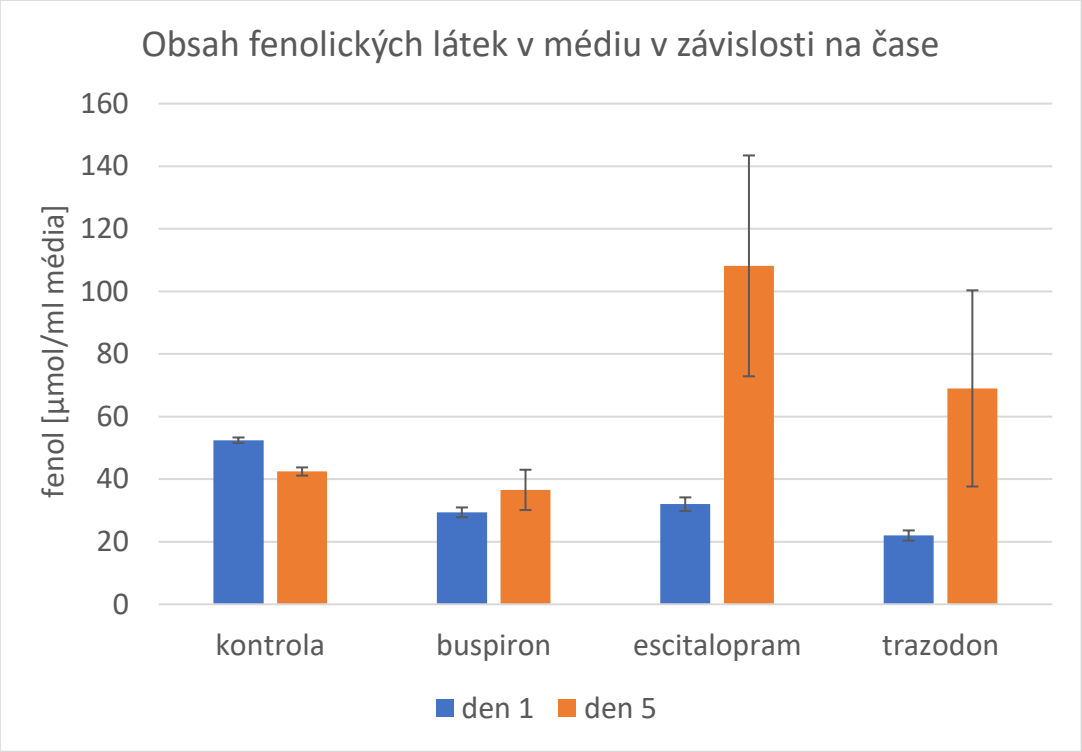
Obrázek č. 14 ukazuje výsledky detekce chalkonsynthasy v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK). ST označuje barevný proteinový standard, který slouží k analýze molekulové hmotnosti proteinů. Jednotlivé šipky označují detekované pásy chalkonsynthasy.

Detekce chalkonsynthasy vykazuje variabilitu mezi vzorky z listů a kořenů různě ošetřených rostlin. V listech kontrolní skupiny (KL) je detekce chalkonsynthasy nejvýraznější, především v pásmech označených šipkami 2, 4 a 6. Listy ošetřené escitalopramem (EL) mají také výraznou detekci chalkonsynthasy, zejména v pásmech 2 a 4. Listy ošetřené trazodonem (TL) vykazují detekci, kde je obzvláště výrazný pás 2. Listy ošetřené buspironem (BL) mají viditelné pásy chalkonsynthasy, i když méně výrazné než kontrola, hlavně v pásmech 5, 6 a 7.

Jediný vzorek kořenů, který vykazuje viditelnou detekci chalkonsynthasy, je kontrolní kořen (KK), kde jsou patrné proteiny označené šipkou 2 a 5. Ostatní kořenové vzorky (TK, BK, EK) vykazují velmi slabou nebo pod limitem detekce.

Celkově výsledky naznačují, že chalkonsynthasa je přítomna hlavně v listech, přičemž nejvýraznější detekce je v listech kontrolní skupiny (KL), escitalopramem (EL) a trazodonem (TL). Kořeny vykazují mnohem slabší detekci, s výjimkou kontrolních kořenů (KK), kde je přítomnost reakce protilátky proti chalkonsynthase pozorovatelná v několika pásmech.

8.5. Analýza kultivačních médií

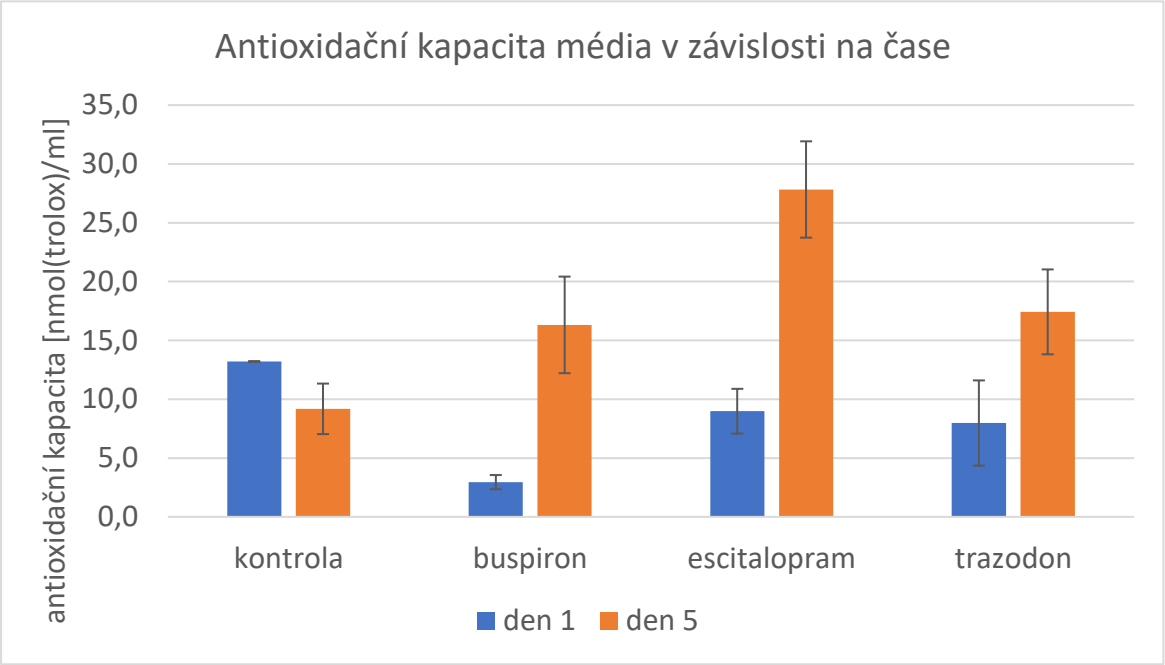


Graf 19: Stanovení obsahu fenolických látek v médiu v závislosti na čase. Byly analyzovány odběry média na začátku experimentu (den 1) a v ke konci kultivace s léčivem (den 5).

Graf č. 19 ukazuje obsah fenolických látek v médiu v závislosti na čase (den 1 a den 5) pro různé skupiny: kontrola, buspiron, escitalopram a trazodon. V kontrolní skupině je obsah fenolických látek v odběru ze dne č. 1 vyšší než ze dne č. 5, kdy došlo k mírnému poklesu. U skupiny ošetřené buspironem je obsah fenolických látek ze dne č. 1 vyšší než ze dne č. 5, kde se obsah mírně snížil. Ve skupině pěstované escitalopramem je obsah fenolických látek 1. den nižší než 5. den, kdy došlo k výraznému čtyřnásobnému nárůstu. U skupiny

ošetřené trazodonem je ve dni č. 1 obsah fenolických látek nižší než ze dne č. 5, kdy došlo k výraznému trojnásobnému nárůstu.

Celkově graf ukazuje, že v kontrolní skupině a ve skupině ošetřené buspironem došlo k mírnému poklesu obsahu fenolických látek mezi dnem 1 a dnem 5. Naopak ve skupinách ošetřených escitalopramem a trazodonem došlo k výraznému nárůstu obsahu fenolických látek v médiu mezi dnem 1 a dnem 5. Tento nárůst je nejvýraznější u skupiny ošetřené escitalopramem.

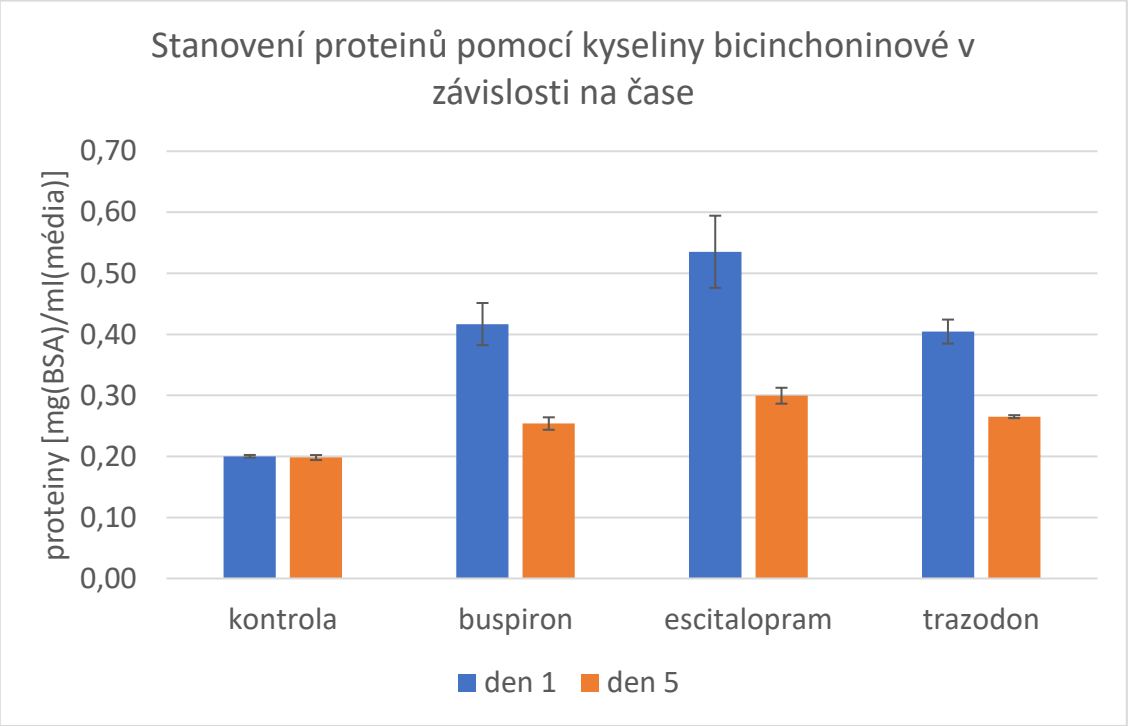


Graf 20: Stanovení antioxidační kapacity média v závislosti na čase. Byly analyzovány odběry média na začátku experimentu (den 1) a v ke konci kultivace s léčivem (den 5).

Graf č. 20 ukazuje antioxidační kapacitu média v závislosti na čase (den 1 a den 5) pro různé skupiny: kontrola, buspiron, escitalopram a trazodon. V kontrolní skupině je antioxidační kapacita den č. 1 vyšší než dne č. 5, kdy došlo k poklesu přibližně o 33 %. U skupiny ošetřené buspironem je dne 1 antioxidační kapacita nízká, ale dne č. 5 došlo k výraznému nárůstu, více než trojnásobně. Ve skupině ošetřené escitalopramem je den č. 1 antioxidační kapacita nižší než dne č. 5, kdy došlo k výraznému nárůstu, přibližně čtyřnásobně. U skupiny ošetřené trazodonem je den č. 1 antioxidační kapacita nižší než dne č. 5, kdy došlo k výraznému nárůstu, přibližně dvojnásobně.

Celkově graf ukazuje, že v kontrolní skupině došlo k poklesu antioxidační kapacity mezi dnem 1 a dnem 5. Naopak ve skupinách ošetřených buspironem, escitalopramem a

trazodonem došlo k výraznému nárůstu antioxidační kapacity mezi dnem 1 a dnem 5. Tento nárůst je nejvýraznější u skupiny ošetřené escitalopramem.



Graf 21: Stanovení proteinů pomocí kyseliny v médiu v závislosti na čase. Byly analyzovány odběry média na začátku experimentu (den 1) a v ke konci kultivace s léčivem (den 5).

Graf č. 21 ukazuje stanovení množství proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové v různých skupinách: kontrola, buspiron, escitalopram a trazodon, dne č. 1 a dne č. 5. V kontrolní skupině je množství proteinů den č. 1 a den č. 5 téměř stejné, s velmi malým poklesem 5. den. U skupiny ošetřené buspironem je den č. 1 množství proteinů vyšší než den č. 5, kdy došlo k poklesu přibližně o 30 %. Ve skupině ošetřené escitalopramem je den č. 1 množství proteinů vyšší než den č. 5, kdy došlo k poklesu přibližně o 50 %. U skupiny ošetřené trazodonem je den č. 1 množství proteinů vyšší než den č. 5, kdy došlo k poklesu přibližně o 40 %.

Celkově graf ukazuje, že ve všech skupinách obsahujících léčivo v médiu došlo mezi dnem č. 1 a dnem č. 5 k poklesu množství proteinů. Tento pokles je nejvýraznější u skupiny ošetřené escitalopramem, zatímco v kontrolní skupině je pokles množství proteinů minimální.

9. Diskuse

Fytoremediace je důležitý proces pro odstranění kontaminantů z životního prostředí. Příjem xenobiotik rostlinami zahrnuje specifický aktivní i pasivní transport látek. Kromě několika sloučenin s hormonální strukturou, které mohou být přijímány aktivním transportem, se předpokládá, že xenobiotika vstupují do rostliny převážně pasivní difuzí, a jejich další distribuce v rostlině je řízena specifickými transportními procesy [77].

Listy rostlin pěstovaní v médiu s buspironem vykazují mírný nárůst antioxidační kapacity ve srovnání s kontrolou. Obsah fenolických látek je výrazně vyšší, což naznačuje zvýšenou odpověď na oxidační stres. V kořenech je antioxidační kapacita a obsah fenolických látek nižší než v listech, ale stále vyšší než v kontrolní skupině, což naznačuje, že buspiron vyvolává systémovou stresovou reakci v rostlině. Během šestidenního experimentu bylo vyextrahováno 77,3 % léčiva, což odpovídá průměrnému poklesu koncentrace o 2,9 mg/l.

Listy rostlin pěstované s escitalopramem v médiu vykazují výrazný nárůst antioxidační kapacity, zejména pátý den, což naznačuje silnou odpověď na oxidační stres. Obsah fenolických látek se také výrazně zvyšuje, což naznačuje posílené obranné mechanismy. V kořenech přítomnosti escitalopramu také zvyšuje antioxidační kapacitu a obsah fenolických látek, i když v menší míře než v listech, což ukazuje, že kořeny jsou méně citlivé na escitalopram. Během pětidenního experimentu bylo vyextrahováno 70 % léčiva, což odpovídá průměrnému poklesu koncentrace o 2,8 mg/l.

Listy rostlin pěstované s trazodonem v médiu vykazují mírný nárůst antioxidační kapacity a obsahu fenolických látek ve srovnání s kontrolní skupinou, což naznačuje, že trazodon vyvolává mírnou odpověď na oxidační stres v listech. V kořenech jsou podobné trendy s mírným nárůstem antioxidační kapacity a obsahu fenolických látek, což naznačuje, že trazodon ovlivňuje obě pletiva podobně. Během osmidenního experimentu bylo vyextrahováno 77,2 % léčiva, což odpovídá průměrnému poklesu koncentrace o 2,64 mg/l.

Buspiron a trazodon vykazují podobné trendy v poklesu koncentrace léčiva a zvýšení antioxidační kapacity a obsahu fenolických látek v listech a kořenech. Tato podobnost může být způsobena podobnými mechanismy účinku těchto léčiv na rostliny, které zahrnují zvýšení produkce antioxidačních enzymů a dalších obranných mechanismů.

Cílem této přehledové práce bylo zdůraznit význam rostlin v procesu detoxikace veterinárních léčiv v životním prostředí, přičemž byly posouzeny možnosti využití rostlin pro fytoremediační technologie.

Souhrnný článek od Kózka et al. z roku 2020 [75] provedl fytoextrakci na houbě Pleurotus ostreatus. Zjistili, že houba Pleurotus ostreatus byla účinná pro odstraňování několika léčiv z kultivačního média. Mezi testovanou látkou bylo také antidepresivum citalopram. Podle výsledků experimentu byl citalopram během 96 hodin odstraněn pouze mírně, s účinností až 50%. Tento výsledek byl pozorován při koncentraci 2,5 µg/mL. Zajímavé je, že účinnost odstranění citalopramu byla vyšší při vyšších koncentracích než při nižších. Výsledky naznačují, že mechanismus odstranění zahrnuje jak adsorpci, tak enzymovou degradaci. V této práci byla stanovená účinnost fytoextrakce escitalopramu, S-enantiomeru citalopramu, pomocí rostlin kukuřice byla o 20% vyšší. Dle prvního odběru i zde výsledky naznačily adsorpci léčiva na kořeny. V rostlinách lze také předpokládat enzymovou přeměnu escitalopramu např. jeho konjugaci s GST s následným uložením do vakuoly nebo oxidaci vlivem peroxidas.

Aktivita celkových volných peroxidas v listech a kořenech je u všech zkoumaných skupin rostlin velmi podobná a nevykazuje výrazné rozdíly. U kontrolní skupiny je aktivita peroxidas v listech i kořenech téměř shodná. Při použití buspironu je aktivita peroxidáz v listech mírně nižší než v kořenech, s rozdílem kolem 5 %. U rostlin ošetřených escitalopramem je aktivita peroxidas v listech a kořenech téměř vyrovnaná, s nepatrným rozdílem kolem 2 %. Při použití trazodonu jsou hodnoty aktivity peroxidas v listech a kořenech opět velmi podobné, s rozdílem přibližně 3 %. Celkově lze říci, že aktivita celkových volných peroxidas je mezi jednotlivými skupinami a mezi listy a kořeny velmi konzistentní, bez výrazných rozdílů. Souhrnný článek od Ryšlavé et al. z roku 2015 [76] také analyzuje aktivitu peroxidas. Výsledky z článku ohledně aktivity peroxidas ukazují, že přítomnost xenobiotik v kultivačním médiu může způsobit indukci antioxidačního systému, což je patrné zejména u listech slunečnice. Nejvyšší nárůst aktivity byl zaznamenán u membránově vázaných peroxidas ve slunečnicových listech, u rozpustných peroxidas v kořenech slunečnice (při působení 10,11-epoxykarbamazepinu), a také u membránově vázaných peroxidas v kořenech slunečnic při působení ibuprofenu a 10,11-epoxykarbamazepinu.

Detekce isoform GST ukázala, že v listech je aktivta isoforem velmi slabá ve všech vzorcích, tedy bez ohledu na přítomnost léčiv a kontrolní skupiny. V kořenech byly

identifikovány čtyři isoformy, přičemž nejvyšší intenzitu vykazuje varianta s escitalopramem. Kořeny kontrolní skupiny a ostatních léčiv vykazují nižší intenzitu isoforem. Souhrnný článek od Mittonu et al. z roku 2018 [74] ukazuje aktivitu GST. Ve studií byla měřena aktivita GST u rajčat a cuket, které byly vystaveny 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (DDT). Výsledky ukázaly, že odpověď rostlin je specifická pro různá pletiva. V rajčatech byla aktivita GST v kořenech po expozici DDT významně snížena, zatímco v listech se aktivita GST zvýšila. Stonky nevykazovaly žádné významné změny. Tento výsledek naznačuje, že kořeny, které jsou primárním místem příjmu znečišťující látky, měly inhibován tento enzym kvůli vysokým koncentracím DDT. Naopak v listech, kde jsou koncentrace DDT nižší, může dojít k aktivaci GST jako obranného mechanismu.

Detekce isoform GPX v listech všech vzorků je velmi slabá nebo téměř žádná. V kořenech jsou detekovány čtyři isoformy, nejvyšší intenzita je patrná u vzorku s escitalopramem. Kořeny kontrolní skupiny a ostatních léčiv vykazují nižší intenzitu isoform. Souhrnný článek od Mittonu et al. z roku 2018 [74] analyzoval aktivitu GPX. Aktivita GPX rovněž vykazovala odpovědi specifické pro různá pletiva. Obecně byla vyšší aktivita GPX pozorována v kořenech a stoncích ve srovnání s listy. V rajčatech byla významně zvýšená aktivita GPX zaznamenána pouze v listech po expozici DDT. Toto zvýšení aktivity GPX v listech naznačuje, že oxidační stres vyvolaný DDT v listech je kompenzován aktivací GPX, která hraje klíčovou roli v detoxikaci ROS.

Tato zjištění zdůrazňují rozdílné reakce antioxidačních enzymů v rajčatech a cuketách, což odráží jejich různou schopnost zvládat oxidační stres vyvolaný expozicí DDT.

Detekce aktivity proteas ukázala, že v listech všech vzorků je detekce proteasové aktivity velmi slabá nebo téměř žádná. V kořenech jsou detekovány různé proteasové aktivity, nejvyšší intenzita je patrná u vzorku s buspironem. Kořeny kontrolní skupiny a ostatních léčiv vykazují různé intenzity proteasových aktivit. Zajímavým fenoménem je výrazně zvýšená proteolytická aktivita v kořenech rostlin vystavených buspironu. Tato aktivita může souviset s udržováním homeostasy, zpracováním poškozených nebo nepotřebných proteinů, reakcemi rostlin na stresové podmínky prostředí, a dokonce i s procesy spojenými s programovanou buněčnou smrtí.

Souhrnný článek od Schweighofer et al. z roku 2015 analyzoval aktivitu fosfatas. Ve studii vědci se zaměřili na roli fosfatas v rostlinách, především na jejich klíčovou funkci v buněčné signalizaci a obranných mechanismech. Fosfatasy jsou zodpovědné za odstraňování fosfátových skupin z proteinů, čímž regulují mnoho buněčných procesů. Ve srovnání s proteinovými kinasami, které přidávají fosfátové skupiny, mají fosfatasy menší počet zástupců, ale hrají stejně důležitou roli při udržování rovnováhy v buněčných signálních dráhách. Konkrétně v rostlinách *Arabidopsis thaliana* studie zmiňuje, že fosfatasy se podílejí na regulaci obranných mechanismů proti patogenům, stresových reakcí, světelné a hormonální signalizace, buněčného cyklu a diferenciace, metabolismu a růstu rostlin. Bylo také popsáno, že fosfatasy vykazují vysokou specifitu v rozpoznávání substrátů a hrají důležitou roli v signálních drahách souvisejících s patogenní obranou a regulací stresu [78]. V této práci aktivity alkalických fosfatas v listech a kořenech se liší v závislosti na použitém léčivu. V kontrolní skupině je aktivita vyšší v listech než v kořenech. U rostlin ošetřených buspironem je aktivita v listech a kořenech téměř vyrovnaná, u escitalopramu a trazodonu je vyšší v kořenech. U kyselých fosfatas je v kontrolní skupině vyšší aktivita v kořenech, zatímco u buspironu je vyšší v listech. U escitalopramu a trazodonu jsou aktivity mezi listy a kořeny téměř vyrovnané. Pravděpodobně tedy i drobné rozdíly v aktivitě fosfatas v rostlinách kontaminovaných léčivy v médiu mohou souviset se změnami v signální drahách, které reagují na přítomnost xenobiotika v rostlinném pletivu.

Souhrnný článek od Kannanu et al. z roku 2023 analyzoval aktivitu β-glukosidasy. β-glukosidasy v rostlinách plní důležité funkce v různých oblastech, jako je obrana a interakce s mikroorganismy, metabolismus buněčné stěny a lignifikace, aktivace fytohormonů, signalizace a sekundární metabolismus rostlin. Vzhledem k tomu, že rostliny jsou nepohyblivé organismy, které se nemohou aktivně bránit predátorům, vyvinuly schopnost syntetizovat sekundární metabolity, které jim pomáhají chránit se a přizpůsobit se různým abiotickým stresům. β-glukosidasy fungují jako bioaktivátory v obraně rostlin, a to jak na úrovni interakcí mezi rostlinami a mikroby, tak mezi rostlinami a hmyzem. Hrají klíčovou roli při degradaci oligosacharidů vznikajících při obnově buněčné stěny a lignifikaci, čímž přispívají ke stabilizaci buněčných stěn tím, že uvolňují monolignoly z jejich glykosidů. Dále se podílejí na uvolňování vůní květin a atraktantů pro opylovače [80].

Aktivita β-glukosidasy je vyšší v listech než v kořenech u všech zkoumaných skupin. Nejvýraznější rozdíl je u rostlin ošetřených buspironem, kde je aktivita v listech výrazně vyšší než v kořenech. Pravděpodobně tedy v tomto případě zvýšení aktivity β-glukosidasy souvisí se změnami buněčné stěny v souvislosti se snahou zabránit prostupnosti buspironu do nadzemní části rostliny.

Proteiny teplotní šoku (HSP) hrají významnou roli ve vývoji rostlin a v reakci na abiotické a biotické stresové podmínky. Rodina HSP zahrnuje celou řadu proteinů o velikosti od 10 kDa do >100 kDa. V rostlinách lze rozlišit čtyři třídy, které působí v cytosolu, mitochondriích, chloroplastech nebo endoplazmatickém retikulu. Geny a proteiny HSP70 reagují na fytohormony, což jsou nízkomolekulární regulátory, které regulují růst a vývoj rostlin a usnadňují integraci signálů prostředí, včetně biotických a abiotických stresorů [80]. V této práci byla sledována přítomnost cytosolové formy HSP70, jejíž zastoupení se výrazně lišilo v kořenech i listech kontaminovaných buspironem z média. Oproti ostatním variantám obsahovaly tyto kořeny i listy velké zastoupení isoforem popř. degradačních produktů HSP70 o molekulové hmotnosti 25-40 kDa a zároveň zde bylo pozorováno významné snížení isoformy o velikosti 70 kDa. Lze tedy předpokládat, že se jedná o isoformy reagující na abiotickou formu stresu vyvolanou buspironem, který zřejmě představuje pro rostliny vyšší stresovou zátěž než escitalopram a trazodon.

Detekce chalkonsynthasy vykazuje variabilitu mezi vzorky z listů a kořenů různě ošetřených rostlin. Listy kontrolní skupiny a rostlin ošetřených escitalopramem a trazodonem vykazují nejvýraznější detekci chalkonsynthasy. Kořeny vykazují mnohem slabší detekci, s výjimkou kontrolních kořenů, kde je přítomna detekce v několika pásmech. Chalkonsynthasa je klíčový enzym v biosyntéze flavonoidů, což jsou nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity, které jsou důležité pro ochranu rostlin před reaktivními formami kyslíku. Exprese genu pro chalkonsynthasu je v rostlinách indukována za stresových podmínek, jako je UV záření, bakteriální nebo houbová infekce. Zvýšení obsahu chalkonsynhasy způsobuje akumulaci flavonoidů a isoflavonoidů a je zapojena do obranné dráhy kyseliny salicylové.V této práci byla detekována pomocí specifické protilátky proti chalkonsynthase řada proteinů v oblasti 20-70 kDa. Majoritní proužek chalkonsynthasy by měl mít dle výrobce protilátky (Agrisera, Švédsko) velikost 43,1 kDa. Nicméně v databázi BRENDA [83] lze pro chalkonsynthasu najít molekulovou hmotnost 40-120 kDa v závislosti na dané rostlině. Nejvyšší zastoupení chalkonsynthasy bylo pozorováno v listech kontrolních rostlin. Listy rostlin kontaminovaných léčivy v médiu vykazovaly nižší intenzitu proteinů o různých

molekulových hmotnostech (20-70 kDa). V souvislosti s dalšími výsledky lze předpokládat, že rostlina je přítomností léčiv vystavena stresu a některé energeticky náročné biosyntetické dráhy musí tedy omezit, což může být i tento případ.

Ve stresových podmínkách se kořenové exudáty podílí na zvýšení účinnosti využití zdrojů živin a signalizaci. V této práci bylo pozorováno zvýšení obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity na čase v médiích obsahujících vybraná léčiva. Jedná se tedy patrně o reakci rostlin na přítomnost abiotického stresoru. Na druhé straně byl pozorován pokles obsahu proteinů v médiu na čase. Může se jednat např. o sekretované enzymy, které také reagují na přítomnost léčiva. Lze například předpokládat, že léčiva mohou být přeměňována peroxidasami na metabolity, které budou pro rostlinu méně toxické.

Z hlediska fytoremediace vykazuje trazodon a buspiron velmi podobné chování, kdy během kultivačního experimentu bylo zachyceno kolem 23 % původního množství xenobiotika. Výsledky u escitalopramu se mírně liší, pozorovaný záchyt byl nepatrně vyšší. Podobnost výsledků trazodonu a buspironu může souviset se strukturní podobností. Escitalopram je na rozdíl od trazodonu a buspironu, který je strukturně založen na dusíkatých heterocyklech, odlišná molekula obsahující atom fluoru, nitrilovou skupinu, a etherový můstek. Lze tak předpokládat rozdílné adsorpční i absorpční vlastnosti vzhledem ke kořenovému pletivu. Při srovnání s experimenty za stejných či velmi podobných podmínek a se stejným kultivarem kukuřice pro další farmaka, je účinnost záchytu buspironu, escitalopramu a trazodonu výrazně nižší. Za stejných podmínek je například extrakce olanzapinu či mianserinu výrazně vyšší, nad 90 % [84] a u ibuprofenu dosahuje téměř 100 % [85]. Rozdíly mohou být způsobeny řadou faktorů, jako je třeba rozpustnost či lipofilita molekuly. Nezanedbatelná může být i geometrie molekuly, která může dramaticky ovlivnit primární afinitu k povrchu kořenů, ať už zůstane u adsorpce, či dojde k dalšímu aktivnímu či pasivnímu transportu, který dle výsledků biochemických experimentů zjevně probíhá. Jednoduché srovnání na základě rozpustnosti či lipofility na řadě testovaných léčiv nevede k jednoznačnému výsledku, i když se zdá, že se vyskytuje určitá tendence směrem k vyšším záchytům u rozpustnějších substrátů, což by naznačovalo významný vliv pasivní difuze. Studium procesů vlastního mechanismu by vyžadovalo další studie v multikomponentních systémech xenobiotik, kdy by se daly procesy interpretovat z hlediska preference adsorpčních či absorpčních průběhů. Z hlediska celkového posouzení však je zřejmé, že záchyt studovaných xenobiotik je reálný a využitelný i v kořenových čistírnách či obdobném kvartérním dočišťování komunálních odpadních vod.

10. Závěr

Z hlediska možností využití technologického procesu fytoextrakce bylo prokázáno, že studovaná xenobiotika jsou zachycována kořenovým systémem rostlin kukuřice seté a dochází k ovlivnění biochemických parametrů i v nadzemních částech rostlin. Výsledky tak ukazují možnost aplikace kořenové filtrace pro dočišťování v kvartérních stupních čištění komunálních odpadních vod. Poukazují však zároveň na přítomnost studovaných látek v použitých rostlinách, a tudíž i nutnost následné specifické likvidace použitých rostlin. Nezanedbatelným výsledkem je i značná pravděpodobnost průniku studovaných látek do ekosystému.

Výsledky této studie rovněž prokázaly, že léčiva escitalopram, buspiron a trazodon mají významný vliv na fyziologické a biochemické procesy v rostlinách. Antioxidační kapacita a obsah fenolických látek byly vyšší v listech než v kořenech, přičemž escitalopram vykazoval nejvýraznější účinky. Aktivita volných peroxidas, glutathion-S-transferas, glutathionperoxidas a proteáz byla konzistentní napříč vzorky, přičemž nejvyšší aktivita byla pozorována v rostlinách pěstovaných s escitalopramem a buspironem. Aktivita alkalických a kyselých fosfatas se lišila v závislosti na léčivu, s vyššími hodnotami v listech nebo kořenech v závislosti na daném léčivu. Imunochemická analýza ukázala přítomnost HSP70 a chalkonsynthasy, s vyšším množstvím těchto proteinů v listech než v kořenech. V kultivačních médiích byla detekována přítomnost fenolických látek, antioxidantů a proteinů. Celkově lze konstatovat, že léčiva významně ovlivňují antioxidační kapacitu a vybrané enzymové aktivity v rostlinách, což může být důsledkem zvýšené indukce obranných mechanismů proti abiotickému stresu vyvolanému těmito látkami. Tato zjištění přispívají k lepšímu pochopení interakcí mezi léčivy a rostlinami, což může vést k zvýšení efektivity fytoremediační vlastnosti rostlin.

11. Použita literatura

[1] Department of the Parliament of the Republic of Kazakhstan: *About medicines.* Dostupné z URL: https://adilet.zan.kz/rus/docs/U950002655_ [cit. 12.12.2023]

[2] Boxall A. B.: The environmental side effects of medication. *EMBO reports*, 12:5, 1110–1116 (2004).

[3] Belousov Yu.B.; Moiseev V.S.; Lepakhin V.K: *Clinical pharmacology and pharmacotherapy.* 2nd ed. Moscow, 1993. ISBN 5-86034-068-0.

[4] Sumpter J.: *Green and Sustainable Pharmacy*. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. ISBN: 978-3-642-05198-2.

[5] Williams R.T.; Cook J.C.: Exposure to Pharmaceuticals Present in the Environment. *Drug Information Journal*. 41, 133-141 (2007).

[6] Daigle J.: Acute responses of freshwater and marine species to ethinyl estradiol and fluoxetine. Thesis, USA: Louisiana State University, 2010.

[7] Anekwe, J. E.; Abou-Elwafa A, M; Harrad, S.: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*., 3:1, 1-16 (2017).

[8] Andreozzi, R.; Raffaele, M..; Nicklas, P.: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50:10, 1319–1330 (2003).

[9] Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D.: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxikology.* 76:2, 122–159 (2006).

[10] Institute of Pharmacology and Toxicology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine: *Environmental potential of innovative phytopreparations production.* Dostupné z URL: http://www.health-medix.com/articles/misteztvo/2009-10-10/03_EPIPF.pdf [cit. 14.12.2023]

[11] Yale School of the Environment. *As Pharmaceutical Use Soars, Drugs Taint Water and Wildlife*. Dostupné z URL: https://e360.yale.edu/features/as_pharmaceutical_use_soars_drugs_taint_water_and_wildlife [cit. 20.12.2023]

[12] Executive Agency for Health and Consumers. *Study on the environmental risks of medicinal products*. Dostupné z URL: https://health.ec.europa.eu/system/files/2016- 11/study_environment_0.pdf [cit. 20.12.2023]

[13] Zakharenko A. V.: Peculiarities of the impact of pharmaceutical preparations on the environment: Ways to minimize the consequences in Germany. *Social problems of social development*. 1-6 (2023).

[14] Umweltbundesamt. *Arzneimittel in der Umwelt – vermeiden, reduzieren, überwachen.* Dostupné z URL:https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/01.08.2014_hintergrundpapier_arzneimittel_final_.pdf [cit. 28.12.2023]

[15] Fraunhofer Institute for Intelligent Analysis and Information Systems. *Organic trace substances in the water cycle.* Dostupné z URL: https://www.acatech.de/wp- content/uploads/2018/03/acatech_Materialband_Nr12_WEB.pdf [cit. 30.12.2023]

[16] Report by the IMS Institute for Healthcare Informatics. *Global Use of Medicines in 2020.* Dostupné z URL: https://www.iqvia.com/-/media/iqvia/pdfs/institute-reports/global-medicines-use-in-2020.pdf [cit. 30.12.2023]

[17] Statista. *Revenue of the worldwide pharmaceutical market from 2001 to 2023* Dostupné z URL: https://www.statista.com/topics/1764/global-pharmaceutical-industry/#editorsPicks [cit. 30.12.2023]

[18] Cardoso, O.; Porcher, J. M.; Sanchez, W.: Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: review of evidence and need for knowledge. *Chemosphere*, 115, 20–30 (2014).

[19] World Health Organization: *Pharmaceuticals in drinking-water*. Dostupné z URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44630/9789241502085_eng.pdf?sequence=1 [cit. 11.1.2024]

[20] Kot-Wasik, A.; Jakimska, A.; Śliwka-Kaszyńska, M.: Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. *Environmental monitoring and assessment*, 188:12, 661 (2016).

[21] Caban, M.; Bialk-Bielinska A.; Stepnowski, P.; Kumirska J.: Current Issues in Pharmaceutical Residues in Drinking Water. *Current analytical chemistry*. 12:3, 249-257 (2006).

[22] Heberer, T.: Tracking Persistent Pharmaceutical Residues from Municipal Sewage to Drinking Water. *Journal of Hydrology*, 266:3, 175-189 (2002).

[23] Besse, J. P.; Kausch-Barreto, C.; Garric, J.: Exposure Assessment of Pharmaceuticals and Their Metabolites in the Aquatic Environment: Application to the French Situation and Preliminary Prioritization. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal.* 14:4, 665–695 (2008).

[24] Wang, C.; Ni, F.; Deng, Y.; Jiang, L.: Research on the Risk Associated with Rural Drinking Water Safety Based on Catastrophe Theory. *Journal of Water Resource and Protection*, 3:6, 356-362 (2011).

[25] Glassmeyer, S. T.; Furlong, E. T.; Kolpin, D. W.; Cahill, J. D.; Zaugg, S. D.; Werner, S. L.; Meyer, M. T.; Kryak, D. D.: Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environmental science & technology*. *39*:14, 5157–5169 (2005).

[26] Bound, J.P.; Voulvoulis, N.: Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives*. 113:12, 1705-1711 (2005).

[27] Yagodin B.A.: Heavy metals and human health. *Chemistry in agriculture.* 1, 18-20 (1999).

[28] Olshanskaja, L.N.; Sobgajda, N.A.; Russkih, M.L.; Valiev R.Sh.; Aref'eva O.A.: Phytoremediation energy-saving technology in solving problems of pollution of the hydrosphere. *Innovations.* 2:9, 166-172 (2012).

[29] Pulford, I. D.; Watson, C.: Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment international*, 29:4, 529–540 (2003).

[30] Prasad, M.N.V.: Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology* 50, 686–701 (2003).

[31] Elizar'ev A.N.; Nasyrov A.N.; Nasyrova E.S.: Comprehensive assessment of the ecological status of water bodies in urban areas. *Water: Chemistry and Ecology,* 87:9, 3-11 (2015).

[32] Member Agencies of the Federal Remediation Technologies Roundtable. *Guide to documenting and managing cost and performance information for remediation projects*. Dostupné z URL: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-04/documents/costperf98.pdf [cit. 1.2.2024]

[33] Minaeva O.M.; Akimova E.E.; Minaev K.M.; Semenov S.Ju.; Pisarchuk A.D.: The absorption of a number of heavy metals from aqueous solutions of plants water hyacinth. *Bulletin of Tomsk State University.* 8:4, 106-112 (2009).

[34] Tarushkina Ju.A.; Ol'shanskaja L.N.; Mecheva O.E; Lazutkina A.S.: Higher aquatic plants for sewage treatment. *Ecology and Industry of Russia.* 5, 36-39 (2006).

[35] Kireeva N.A.; Grigoriadi A.S.; Bagautdinov F.J.: Phytoremediation as a way to cleanse soils contaminated by heavy metals. *Eoritical and applied ecology* 3, 5 (2011).

[36] Kopcik G.N.: Modern approaches to remediation of soils contaminated with heavy metals, *Soil Science.* 12, 1564-1572 (2021).

[37] Kopcik G.N.: Problems and prospects of phytoremediation of soils contaminated by heavy metals. *Soil Science.* 9, 1113-1130 (2014).

[38] Dushenkov V.; Nanda Kumar P.B.A.; Motto H.; Raskin I.: Rhirofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology.* 29:5, 1239-1245 (1995).

[39] Wikibrief: *Phytoremediation.* Dostupné z URL:https://ru.wikibrief.org/wiki/Phytoremediation [cit. 11.2.2024]

[40] Vlyssides A.; Barampouti E.M.; Mai S.: Heavy metal removal from water resources using the aquatic plant Apium nodiflorum. *Communication in soil science and plant analysis*. 36:7, 1075-1081 (2005).

[41] Kamal M.; Ghaly A.E.; Mahmoud N.; Côté R.: Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environment International.* 29:8, 1029–1039 (2004).

[42] Ejnor L.O.: Botanical Playground – bioengineering facility for purification of wastewater. *Water resources*. 4, 149–161 (1990).

[43] Nanda Kumar P.B.A.; Dushenkov V.; Motto H.; Raskin I.: Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology.* 9, 1232-1238 (1995).

[44] Ufa State Aviation Technical University: *Assessment of anthropogenic impact on water bodies hydroecological mode*. Dostupné z URL:https://www.rshu.ru/university/dissertations/pdf/2007_elizariev.pdf [cit. 16.2.2024]

[45] Marchiol L.; Assolari S.; Sacco P.; Zerbi G.: Phytoextraction of heavy metals by canola (Brassica napus) and radish (Raphanus sativus) grown on multicontaminated soil. *Environmental Pollution*. 132:1, 21-27 (2004).

[46] The University of Iowa: *Phytoremediation*. Dostupné z URL: https://clu- in.org/download/toolkit/phyto_e.pdf [cit. 19.2.2024]

[47] Lasat M.M.: Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessmentof pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2:5, 1-26 (1999).

[48] Cao A.; Cappai G.; Carucci A.; Muntoni A.: Selection of plants for zinc and lead phytoremediation, *Journal of Environmental Science and Health*, 39:4, 1011–1024 (2004).

[49] Qu R.L.; Li D.; Du R.; Qu R.: Lead uptake by roots of four turfgrass species in hydroponic cultures. *HortScience*. 38:4, 623-626 (2003).

[50] Zolotuhin I.A., Nikulina S.N. and Fedoseeva L.A.: Reducing the concentration of micronutrients in an aqueous medium under the influence of root system. *Ecology.* 1995, 26:3, 248–249 (2005).

[51] U.S. Food and Drug Administration: *Depression medicines*. Dostupné z URL: https://www.fda.gov/media/132665/download?attachment [cit. 3.3.2024]

[52] Choosing initial treatment: *Unipolar major depression in adults.* Dostupné z URL: https://www.uptodate.com/contents/major-depressive-disorder-in-adults-approach-to-initial-management [cit. 3.3.2024]

[53] Science Media Centre: *Expert reaction to a review paper on the serotonin theory of depression.* Dostupné z URL: https://www.sciencemediacentre.org/expert-reaction-to-a-review-paper-on-the-serotonin-theory-of-depression/ [cit. 3.3.2024]

[54] Bekker R.A., Bykov Yu.V. Trittico (trazodone) an unique serotonergic antidepressant with some interesting properties. *Psychiatry and Psychopharmacotherapy.* 20:3, 51–62 (2018).

[55] Romanov DV, Samsonova MD, Yuzbashyan PG. Treatment of mental disorders caused or triggered by somatic and neurological diseases with the use of the multimodal antidepressant trazodone. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 123:2, 81-89 (2023).

[56] https://www.cagliaripad.it/436426/aifa-ritirato-antidepressivo-a-scopo-precauzionale-dalle-farmacie-ecco-lotti-e-info/ [cit. 10.3.2024]

[57] Drobizhev, M. Y., & Ivanov, S. V. Escitalopram representative of a new generation of selective serotonin reuptake inhibitors. *Social and clinical psychiatry*. 15:3, 81-87 (2005).

[58] Montgomery S.A.; Lader M.; Burger V.: Escitalopram and paroxetine in fixed doses for the treatment of social anxiety disorder (SAD). *Nord. J. Psychiatry.* 10:3, 103 (2003).

[59] Department of Clinical Pharmacology, Volgograd Medical University: *Use of tranquilizers in therapeutic practice*. Dostupné z URL:http://attic.volgmed.ru/publishing/lv/s/2004/2/lv-2004-2-009.pdf [cit. 12.3.2024]

[60] Firsova L. D.: Anxiolytics in the practice of a gastroenterologist. *A.S. Loginov Moscow Clinical Research and Practice Center.* 16:30, 82-87 (2020).

[61] FarmIndex: *Tranquilizers, anxiolytics: efficacy and safety of therapy*. Dostupné z URL: https://www.pharmindex.ru/practic/1_psynev.html [cit. 16.3.2024]

[62] Levin O.S.: The use of buspirone in clinical practice. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 115:4, 83-87 (2015).

[63] American Psychiatric Association, DSM-5 Task Force. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™*. 5th ed. Washington, 2013. ISBN: 978-0-89042-555-8.

[64] Pecknold J. C.: A risk-benefit assessment of buspirone in the treatment of anxiety disorders. *Drug Safety.* 16:2, 118-132 (1997).

[65] Sramek J.J.; Hong W.W.; Hamid S.; Nape B.; Cutler N. R.: Meta-analysis of the safety and tolerability of two dose regimens of buspirone in patients with persistent anxiety. *Depress Anxiety.* 9:3, 131-134 (1999).

[66] Carvalho, P.N., Basto, M.C.P., Almeida, C.M.R. et al. A review of plant–pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. *Environmental science and pollution research international.* 21:20, 11729–11763 (2014).

[67] García, P.; Singh, S.; Graciet, E.: New Insights into the Connections between Flooding/Hypoxia Response and Plant Defenses against Pathogens. *Plants.* 13:16, 2176 (2024).

[68] Kapoor, D.; Singh, S.; Kumar, V.; Romero, R.; Prasad, R.; Singh, J.: Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), *Plant Gene*. 19:2, 43 (2009).

[69] Bártíková H.; Skálová L.; Stuchlíková L.: Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug metabolism reviews.* 47:3, 374-387 (2015).

[70] Garduno-Jiménez A.L.; Carter L.J.: Insights into mode of action mediated responses following pharmaceutical uptake and accumulation in plants. *Frontiers in Argonomy*. 5, 1293555 (2024).

[71] Badr, A.; El-Shazly, H.H.; Mohamed, H.I.; Plant Responses to Induced Genotoxicity and Oxidative Stress by Chemicals. *Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Plants*. 103-131 (2021).

[72] Ricci G.; Lo Bello M.; Caccuri A.M.; Galiazzo F.; Federici G.: Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry.* 143:2, 226-230 (1984).

[73] Lin, C.-L.; Chen, H.J.; Hou, W.C.: Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 23, 513–16 (2002).

[74] Spoustová, P.; Hýsková, V.; Müller, K.; Schnablová, R.; Ryšlavá, H.; Čeřovská, N.; Malbeck, J.; Cvikrová, M.; Synková, H. Tobacco Susceptibility to Potato Virus YNTN Infection Is Affected by Grafting and Endogenous Cytokinin Content. *Plant Science.* 235, 25–36 (2015).

[75] Bělonožníková, K.; Vaverová, K.; Vaněk, T.; Kolařík, M.; Hýsková, V.; Vaňková, R.; Dobrev, P.; Křížek, T.; Hodek, O.; Čokrtová, K.; et al. Novel Insights into the Effect of Pythium Strains on Rapeseed Metabolism. Microorganisms *Plant Science.* 8, 1472 (2020).

[76] Mitton F.M.; Gonzalez M.; Monserrat J.M.; Miglioranza KSB.: DDTs-induced antioxidant responses in plants and their influence on phytoremediation process. *Ecotoxicology Environment Safety.* 147, 151-156 (2018).

[77] Kózka B.; Nałęcz-Jawecki G.; Turło J, Giebułtowicz J.: Application of Pleurotus ostreatus to efficient removal of selected antidepressants and immunosuppressant. *Journal of Environmental Management.* 273, 111-131 (2020).

[78] Ryšlavá H.; Pomeislová A.; Pšondrová Š.; Hýsková V.; Smrček S.: Phytoremediation of carbamazepine and its metabolite 10,11-epoxycarbamazepine by C3 and C4 plants. *Environmental science and pollution research international*. 22:24, 20271-20282 (2015).

[79] Schweighofer, A.; Meskiene, I.: Phosphatases in plants. *Methods in molecular biology.* 1306, 25-46 (2015).

[80] Kannan P.; Shafreen M., et al.: A review on applications of β-glucosidase in food, brewery, pharmaceutical and cosmetic industries, *Carbohydrate research.* 530, 108-855 (2023).

[81] Berka M.; Kopecká R.; Berková V.; Brzobohatý B.; Černý M.: Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity. *Journal of experimental botany.* 73:7, 1894-1909 (2022).

[83]https://www.brendaenzymes.org/all_enzymes.php?ecno=2.3.1.74&table=Molecular_Weight [cit. 19.8.2024]

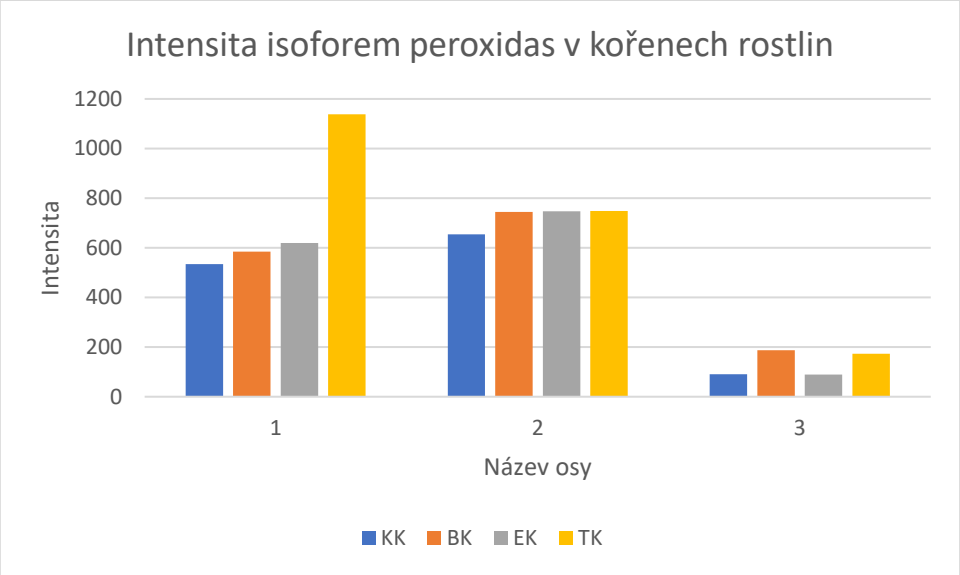
[84] HERČÍKOVÁ, Adéla. Interakce vybraných antidepresiv s vyššími rostlinami jako model environmentální kontaminace. Bakalářská práce, vedoucí Smrček, Stanislav. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra organické chemie, 2024.

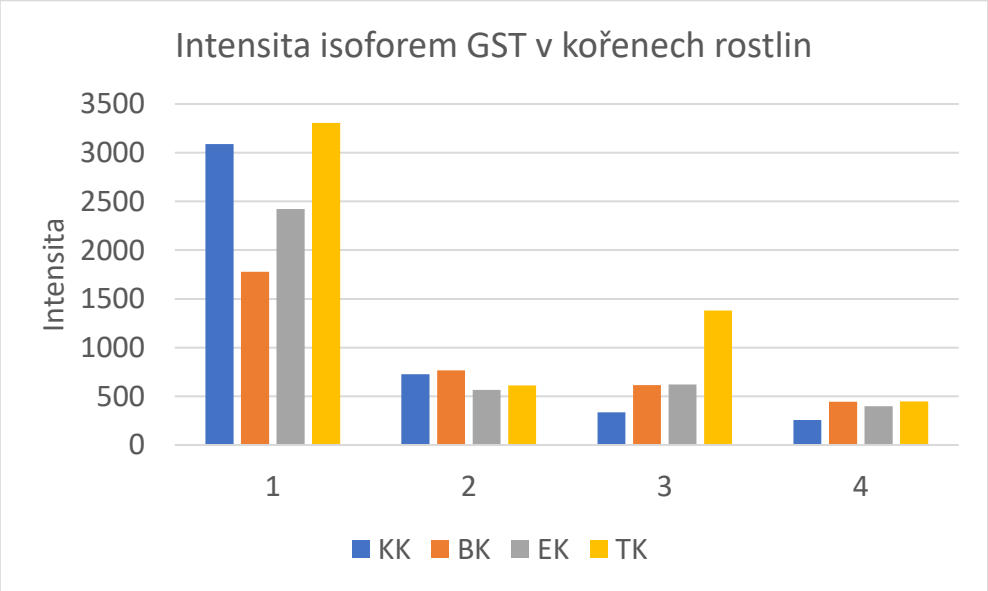
[85] SACHER, Šimon. Fytoextrakce nesteroidních protizánětlivých látek. Bakalářská práce, vedoucí Smrček, Stanislav. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra organické chemie, 2024.

12. Příloha

Příloha 1: Stanovení intenzity isoforem peroxidas v programu GelAnalyzer.

Analýza byla provedena v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK).



Příloha 2: Stanovení intenzity isoforem glutathion-S-transferasy v programu GelAnalyzer.

Analýza byla provedena v listech a kořenech rostlin ošetřených různými léčivy: trazodonem (TL, TK), buspironem (BL, BK), escitalopramem (EL, EK) a kontrolní skupiny (KL, KK).