

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Interakce farmak s vyššími rostlinami jako model  
fytoředičacích procesů**

*Interaction of pharmaceuticals with higher plants as a model of  
phytoremediation processes*

Diplomová práce

**Alice Chupíková**

Školitelé: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.  
Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením školitelů Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc. a Doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat panu Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. a paní Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za jejich odborné vedení a cenné rady při psaní diplomové práce. Také chci poděkovat paní Ing. Šárce Pšondrové, Ph.D. za její vedení a pomoc při sázení a pěstování sterilních rostlin.

## ABSTRACT

The presence of pharmaceuticals in wastewater, which are not eliminated in sewage treatment plant process and thus get easily into rivers and aquatic environment in general, constitutes a severe problem to the whole society. The research into the removal of pharmaceuticals from the environment began about twenty years ago. Phytoremediation represents one of the most promising wastewater treatment methods. It is based on the ability of plants to remove xenobiotics from their environment and sequester them, build them into their tissues or degrade them. Many plant species have been tested as potential phytoremediation agents including maize (*Zea mays* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.). These two plant species were also used for phytoremediation experiments described in this project. The sunflower BELEM variety and the maize G1 variety were cultivated in sterile media containing carbamazepine or its metabolite 10,11-epoxycarbamazepine. The same experiments were carried out with ibuprofen and acetaminophen for comparison. The antiepileptic drug carbamazepine belongs to the group of compounds, which are, due to their high stability, poorly degraded in the environment. Its metabolite 10,11-epoxycarbamazepine was synthesized by epoxidation of the double bond of carbamazepine using *m*-chlorperoxybenzoic acid in chloroform. The removal of all xenobiotics mentioned was observed, showing that carbamazepine was sequestered rather poorly by both plants, while 10,11-epoxycarbamazepine was removed efficiently by maize only. In contrast, ibuprofen and acetaminophen were removed by both plants effectively. The presence of xenobiotics except ibuprofen did not have any significant impact on the growth of plants. The enzymatic activity of NADP-ME, PEPC, PPDK and peroxidases in both bound and soluble fraction in extracts from plant roots and leaves was measured, which indicated the degree of the stress response of plants to the presence of xenobiotics in media. The largest increase of the activity of NADP-ME, PEPC and PPDK was observed in plants cultivated in media with 10,11-epoxycarbamazepine. The activity of NADP-ME and PEPC was increased in roots of maize more than in leaves. This fact could be attributed to an increased requirement of intermediates for various biosynthetic processes. A significant increase of peroxidase activity in bound fraction was observed in both leaves and roots of sunflower. The largest increase of the enzymatic activity of peroxidases in soluble fraction was observed in plants cultivated in media with carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine. It is obvious that the way the plant metabolism is influenced by xenobiotics in media and its extent strongly depends on the plant species used and its way of CO<sub>2</sub> fixation.

# ABSTRAKT

Přítomnost léčiv v odpadních vodách, které se nepodaří odstranit během procesu čištění odpadních vod a které se tímto způsobem dostávají do řek a ostatních složek hydrosféry, představuje vážný problém pro společnost. Teprve během posledních dvou desetiletí začal výzkum ohledně možného odstraňování těchto léčivých látek z životního prostředí. Jednou z perspektivních metod čištění odpadních vod představuje fytoremediace, která je založena na schopnosti rostlin odebírat ze svého okolí cizorodé látky a následně je ukládat nebo zabudovávat do svých pletiv, případně degradovat. V této souvislosti bylo testováno mnoho rostlinných druhů včetně kukuřice (*Zea mays* L.) a slunečnice (*Helianthus annuus* L.), s nimiž byly prováděny fytoremediační experimenty též v rámci tohoto projektu. Rostliny slunečnice odrůdy BELEM a kukuřice odrůdy G1 byly pěstovány ve sterilních médiích, do nichž bylo přidáváno léčivo karbamazepin a jeho metabolit 10,11-epoxykarbamazepin. Pro porovnání byly stejné experimenty prováděny s ibuprofenem a acetaminofenem. Antiepileptikum karbamazepin patří mezi léčivé látky, které jsou díky své vysoké stabilitě v přírodě velice špatně rozložitelné. Jeho metabolit 10,11-epoxykarbamazepin byl připraven epoxidací dvojně vazby karbamazepinu prostřednictvím kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové v chloroformu. Byl sledován úbytek těchto xenobiotik z médií, přičemž se ukázalo, že karbamazepin byl oběma rostlinami přijímán velice neochotně a 10,11-epoxykarbamazepin byl z média efektivně extrahován pouze kukuřicí, zatímco ibuprofen a acetaminofen přijímaly obě rostliny velice snadno. Přítomnost zmíněných xenobiotik přitom neměla na růst rostlin s výjimkou ibuprofenu významný vliv. Dále byla sledovaná aktivita NADP-ME, PEPC, PPK a peroxidas v rozpustné a vázané frakci v extraktech z listů a kořenů obou rostlin, která vypovídala o míře stresové odpovědi rostliny na přítomnost cizorodých látek v médiu. Nejvýraznější nárůst aktivity NADP-ME, PEPC a PPK byl pozorován převážně v rostlinách pěstovaných v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu. Aktivita NADP-ME a PEPC byla v kořenech kukuřice oproti kontrolním rostlinám výrazně zvýšena, a to mnohem více než v listech, což pravděpodobně souviselo se zvýšenou potřebou přísunu intermediátů pro různé biosyntetické procesy. K výraznému zvýšení aktivity peroxidas vázané frakce došlo v kořenech a listech slunečnice. Nejvyšší nárůst enzymové aktivity peroxidas v rozpustné frakci oproti kontrolním stanovením byl pozorován v rostlinách pěstovaných v přítomnosti karbamazepinu a 10,11-epoxykarbamazepinu. Je zřejmé, že způsob a míra ovlivnění metabolismu rostlin použitými xenobiotiky velmi závisí na rostlinném druhu a jeho způsobu fixace CO<sub>2</sub>.

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP – adenosinmonofosfát

ATP – adenosintrifosfát

cDNA – komplementární DNA (complementary DNA)

COX – cyklooxygenasa

CYP – cytochrom P450

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

EC – numerické klasifikační schéma enzymu (enzyme commission number)

EC<sub>50</sub> – střední efektivní koncentrace, při níž xenobiotikum vykazuje toxické fyziologické účinky na daný organismus (the half maximal effective concentration)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ESI – ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)

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

K<sub>m</sub> – Michaelisova konstanta

LC<sub>50</sub> – střední letální koncentrace (the half maximal lethal concentration)

Mr – relativní molekulová hmotnost

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

*m/z* – poměr hmotnost/náboj dané částice

NAD – nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaná forma

NADH – nikotinamidadenindinukleotid, redukována forma

NAD-ME – NAD-dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační

NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, oxidovaná forma

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukována forma

NADP-ME – NADP-dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační

NMR – nukleární magnetická rezonance

PEP – fosfoenolpyruvát

PEPC – fosfoenolpyruvátkarboxylasa

Pi – zbytek kyseliny fosforečné

PPDK – pyruvát-fosfátdikinasa

PPi – pyrofosfát

ppm – miliontina celku (parts per million)

PVP – polyvinylpyrrolidon

RPM – počet otáček za minutu (revolutions per minute)

Rubisco – ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa

$S_N$  – nukleofilní substituce

$S_N$ -1 – nukleofilní substituce monomolekulární

$S_N$ -2 – nukleofilní substituce bimolekulární

TEMED – tertamethylethylendiamin

TLC – chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

UDP – uridindifosfát

# OBSAH

1 ÚVOD .....	11
1.1 Léčiva .....	12
1.1.1 Osud léčiv v odpadních a povrchových vodách .....	13
1.1.2 Vliv léčivých látek v povrchových vodách na životní prostředí .....	14
1.1.3 Ibuprofen .....	15
1.1.4 Acetaminofen .....	17
1.1.5 Karbamazepin .....	19
1.2 Fytoremediace .....	20
1.2.1 Rostliny jako nástroj fytoremediace organických polutantů .....	21
1.2.2 Metabolismus xenobiotik v rostlinách .....	22
1.2.3 Mechanismy fytoremediace .....	23
1.2.3.1 Fytoextrakce/fytoakumulace .....	23
1.2.3.2 Fytostabilizace .....	24
1.2.3.3 Fytotransformace a fytodegradace .....	24
1.2.3.4 Fytovolatilizace .....	24
1.2.3.5 Rhizodegradace .....	25
1.2.3.6 Rhizofiltrace .....	25
1.2.3.7 Kombinované mechanismy .....	25
1.2.4 Metody aplikace fytoremediačních metod .....	26
1.2.5 Umělé mokřady .....	26
1.2.6 Výhled do budoucnosti .....	28
1.3 Vliv stresových faktorů na aktivitu rostlinných enzymů .....	29
1.3.1 Úloha PEPC, NADP-ME a PPKK při fotosyntetické fixaci CO <sub>2</sub> C <sub>4</sub> rostlin ...	29
1.3.2 PEPC .....	30
1.3.2.1 Nefotosyntetické funkce .....	31
1.3.2.2 Role PEPC při stresové odpovědi .....	31
1.3.3 NADP-ME .....	32
1.3.3.1 Nefotosyntetické funkce .....	32
1.3.3.2 Role NADP-ME při stresové odpovědi .....	33
1.3.4 PPKK .....	33
1.3.4.1 Nefotosyntetické funkce .....	34



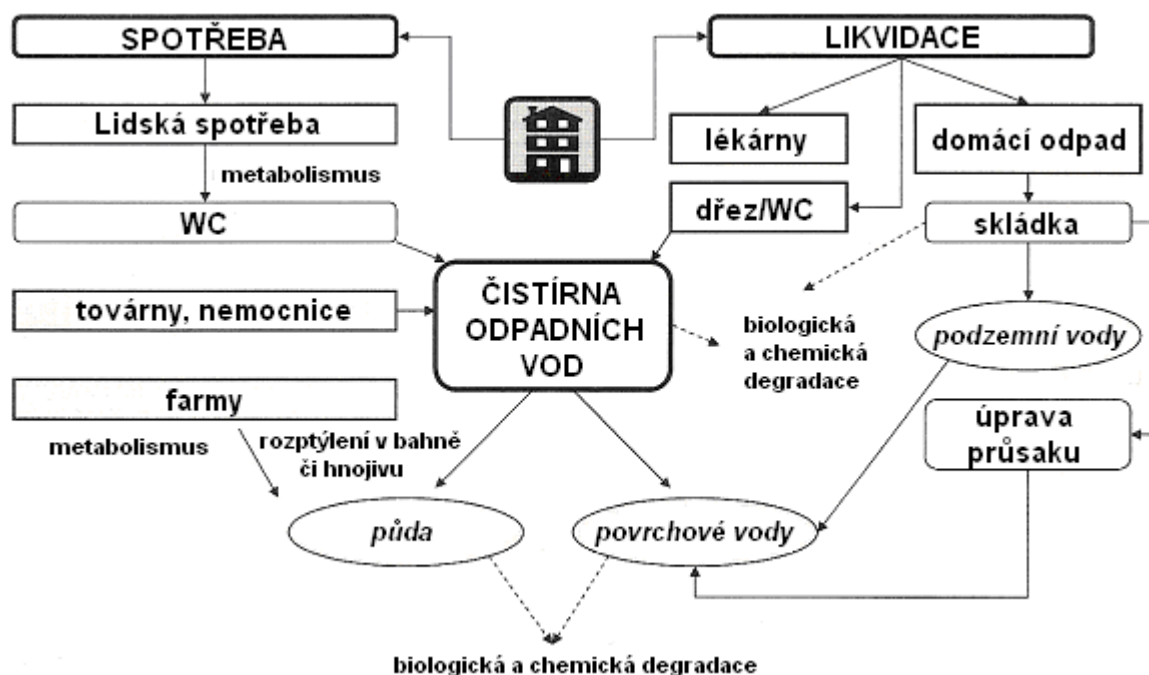
1.3.4.2	Role PPK při stresové odpovědi .....	34
1.3.5	Peroxidasy a jejich úloha při stresové odpovědi .....	34
2	CÍL PRÁCE .....	36
3	MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE .....	37
3.1	Materiál .....	37
3.2	Chemikálie .....	37
3.3	Přístroje .....	38
4	METODY .....	39
4.1	Organická syntéza .....	39
4.1.1	Syntéza 10,11-epoxykarbamazepinu .....	39
4.1.1.1	Oxidace karbamazepinu prostřednictvím oxonu .....	40
4.1.1.2	Oxidace karbamazepinu prostřednictvím kyseliny peroxyoctové .....	41
4.1.1.3	Oxidace karbamazepinu prostřednictvím kyseliny <i>m</i> -chlorperoxybenzoové .....	41
4.1.2	Syntéza 10,11-dihydroxykarbamazepinu .....	42
4.1.2.1	Otevření epoxidu prostřednictvím kyseliny chlorovodíkové .....	43
4.1.2.2	Otevření epoxidu prostřednictvím kyseliny trifluoroctové .....	43
4.1.2.3	Otevření epoxidu hydroxidem sodným .....	44
4.1.2.4	Otevření epoxidu ve vodě .....	44
4.2	Pěstování sterilních rostlin .....	45
4.2.1	Příprava sterilního živného média .....	45
4.2.2	Sázení a pěstování sterilních rostlin .....	46
4.2.3	Přidávání xenobiotik k rostlinám a průběh samotného experimentu .....	46
4.2.4	Měření koncentrace xenobiotik v médiích pomocí HPLC .....	47
4.3	Měření enzymové aktivity .....	48
4.3.1	Příprava extraktu ze vzorků kořene a listů .....	48
4.3.2	Měření enzymové aktivity NADP-ME .....	48
4.3.3	Měření enzymové aktivity PEPC .....	49
4.3.4	Měření enzymové aktivity PPK .....	49
4.3.5	Měření enzymové aktivity peroxidasy .....	49
4.4	Elektroforetické metody: nativní elektroforéza .....	50
4.4.1	Příprava gelu pro elektroforézu .....	50
4.4.2	Příprava vzorků a podmínky elektroforézy .....	51
4.4.3	Detekce NADP-ME a peroxidasy v gelu .....	51

5	VÝSLEDKY .....	52
5.1	Organická syntéza .....	52
5.1.1	Syntéza 10,11-epoxykarbamazepinu .....	52
5.1.2	Syntéza 10,11-dihydroxykarbamazepinu .....	54
5.2	Pěstování sterilních rostlin .....	54
5.2.1	Sledování úbytku koncentrace xenobiotika v médiu rostlin .....	54
5.2.2	Stanovení hmotnosti rostlin .....	56
5.2.3	Stanovení množství xenobiotik uložených do pletiv rostlin .....	58
5.3	Měření enzymové aktivity NADP-ME, PEPC, PPDK a peroxidas v rozpustné a vázané frakci .....	59
5.3.1	Měření aktivity NADP-ME .....	59
5.3.2	Měření aktivity PEPC .....	60
5.3.3	Měření aktivity PPDK .....	61
5.3.4	Měření aktivity peroxidas v rozpustné frakci .....	62
5.3.5	Měření aktivity peroxidas ve vázané frakci .....	63
5.4	Elektroforetické metody: nativní elektroforéza .....	64
5.4.1	Detekce NADP-ME v gelu .....	64
5.4.2	Detekce peroxidas rozpustné frakce v gelu .....	67
6	DISKUSE .....	70
7	SOUHRN .....	75
8	LITERATURA .....	76

# 1 ÚVOD

Vypouštění léčivých látek obsažených v odpadních vodách do životního prostředí představuje velký problém, jehož vážnost si společnost začala uvědomovat teprve v posledních dvaceti letech [1,2]. Odhaduje se, že celosvětová spotřeba aktivních léčivých substancí přesahuje 100 000 tun za rok, v zemích Evropské Unie se jedná o 3000 různých látek [3]. Množství použitých léčiv se například v Německu ročně pohybuje v řádu desítek až stovek tun na jednu konkrétní léčivou látku [1].

Po jejich užití jsou léčiva vyloučena močí či stolicí buď nezměněna, nebo ve formě metabolitů, čímž se dostávají do odpadních vod [1]. Farmaka se mohou dostat do okolního prostředí také příležitostně emisí z továren na výrobu léčiv, z výluhu ze skládek nebo likvidací nespotřebovaných léčiv prostřednictvím komunálního odpadu [4]. Kromě toho chov zemědělských zvířat představuje další významný zdroj veterinárních farmak v přírodě, především pak ve vodních kulturách, jako jsou například rybí farmy [3]. Možné způsoby vstupu léčiv do okolního prostředí jsou znázorněny na obrázku 1.1:



Obrázek 1.1: Možné způsoby kontaminace životního prostředí léčivy (převzato a přeloženo podle Nikolau, A. et al 2007 [4]).

Rozsáhlý výzkum týkající se výskytu léčiv v životním prostředí začal v devadesátých letech minulého století, kdy byly vyvinuty citlivé analytické metody, které umožnily stanovit léčivé látky v odpadních, podzemních i povrchových vodách, v pitné vodě a půdě. Prvotní studie ukázaly, že jednotlivé složky léčiv nejsou zcela odstraněny během procesů čištění odpadních vod. Mnohá léčiva byla na různých místech v přírodě nalezena v podobném množství jako pesticidy, například v řekách, pramenech a jiných složkách hydrosféry dosahovala jejich koncentrace až několik mikrogramů na litr [1].

S rostoucím vědomím o přítomnosti léčiv a místech jejich výskytu se zvyšoval zájem o osud těchto látek v přírodě a jejich možný nežádoucí vliv na životní prostředí [3]. Současně se též zvyšoval zájem o možnosti odstranění těchto xenobiotik z ekosystému [1]. Stávající technologie čištění komunálních odpadních vod eliminuje pouze malou část diskutovaného znečištění, proto jsou vyvíjeny nové, efektivnější a ekonomicky výhodnější postupy, mezi něž patří fytoimediační metody [5].

## 1.1 Léčiva

Léčiva jsou prostředky obsahující zpravidla vysoce biologicky aktivní látky, které vykazují specifické účinky v těle [4,6]. Pojem léčivá látka zahrnuje širokou škálu substancí lišících se strukturou, funkcí a aktivitou, které jsou používány jak v lidské, tak veterinární medicíně k léčbě chorob, při boji s infekcemi anebo k potlačení symptomů [7].

Léčivé látky jsou obecně vylučovány z těla živočichů poté, co jsou částečně nebo zcela přeměněny na metabolity rozpustné ve vodě, avšak značné množství původní látky může být vyloučeno nezměněné. Jakožto tělu cizorodé látky podléhají léčiva procesu biotransformace prostřednictvím enzymů přítomných především v játrech, nejčastěji CYP [7,8]. Za metabolismus velké většiny léčiv je zodpovědných 5 izoforem CYP, konkrétně CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP1A2 [9].

Modifikace léčivých látek biotransformujícími enzymy často vede ke změně jejich biologické aktivity. Tento jev je významný z farmakologického hlediska, neboť mnoho léčivých látek musí napřed podlehnout biotransformaci, aby mohly vykazovat požadované účinky. V řadě případů se však tyto enzymy podílí na snížení toxicity léčiv a tím i jejich účinku [8].

### 1.1.1 Osud léčiv v odpadních a povrchových vodách

Chování a osud léčiv a jejich metabolitů v přírodě není příliš dobře znám. Nízká těkavost léčiv naznačuje, že jejich distribuce bude probíhat především vodním transportem, ale také prostřednictvím potravního řetězce [10].

V procesu čištění odpadních vod jsou dvěma nejdůležitějšími pochody podílejícími se na eliminaci léčiv adsorpce na suspendované pevné látky a biodegradace. Úspěšnost adsorpce závisí na schopnosti léčiva interagovat s částicemi a mikroorganismy prostřednictvím fyzikálních, chemických nebo elektrostatických interakcí. Vzhledem k zápornému náboji většiny přírodních pevných látek jsou molekuly léčiv kyselé povahy tvořící ve vodě anionty, mezi které patří například ibuprofen, acetylsalicylová kyselina nebo diklofenak, eliminovány adsorpcí jen ve velmi malé míře. Jestliže je léčivo rozpustné ve vodě, neúčinnějším procesem podílejícím se na jeho eliminaci bude biodegradace. Tento děj může probíhat buď v aerobních či anaerobních zónách aktivovaného kalu, nebo anaerobně při digesci kalu. Naopak pro likvidaci hydrofóbních léčiv není biodegradace na rozdíl od fyzikální adsorpce na pevné částice příliš významná [10].

Léčiva jsou často vyloučena ve formě konjugovaných nebo nekonjugovaných polárních metabolitů. V čistírnách odpadních vod však může dojít k rozštěpení těchto konjugátů a následnému uvolnění původní aktivní látky [10].

Léčiva, která nejsou snadno degradována v čistírnách odpadních vod, jsou rozptýlena s odtokovou vodou, což má za následek kontaminaci řek i jejich ústí do moře, jezer a v některých případech i pitné a podzemní vody [10].

V povrchových vodách podléhají léčiva nejen biotransformačním a biodegradačním procesům, ale též abiotickým přeměnám, které jsou z hlediska degradace pravděpodobně významnější. Fotodegradace se například ukázala být nejdůležitějším eliminačním procesem diklofenaku, karbamazepin tímto způsobem podléhá pomalé degradaci ve slaných vodách bez přítomnosti jiných organických látek. Efektivita fotodegradace závisí kromě vlastností léčiv na intenzitě slunečního svitu, nadmořské výšce, ročním obdobím a přítomnosti fotosenzitizérů, které jsou schopny produkovat hydroxylové radikály a singletový kyslík (např. nitráty, kyselina huminová) [10].

Bioakumulace prostřednictvím potravního řetězce nebyla prokázána s výjimkou diklofenaku u divokých dravců. V případech výskytu léčiv v podzemní a pitné vodě se jako neúčinnější mechanismy jejich odstranění ukázaly být ozonizace, použití granulovaného aktivovaného uhlí a pokročilé oxidační techniky [10].

Vysoká míra produkce daného léčiva není tolik významná jako jeho vysoká stabilita v přírodě a kritická biologická aktivita, což je například vysoká toxicita nebo schopnost ovlivňovat klíčové biologické procesy jako je reprodukce. Léčiva, která představují potenciální nebezpečí pro životní prostředí, jsou často produkována ve velkém množství, jsou velmi stálá v přírodě a zároveň vykazují vysokou biologickou aktivitu, zejména při dlouhodobém působení [10].

### 1.1.2 Vliv léčivých látek v povrchových vodách na životní prostředí

Cílem většiny léčivých látek je specifický zásah do metabolických a molekulárních procesů v těle, mají však též významné vedlejší účinky. Poté, co se léčiva dostanou do životního prostředí, mohou ovlivňovat stejné metabolické dráhy živočichů, kteří mají identické nebo velmi podobné cílové orgány, tkáně, buňky nebo biomolekuly jako člověk. Určité receptory živočichů se podobají těm lidským, jiné však například chybí nebo jsou odlišné, což vede k rozdílným účinkům na člověka a živočichy. Je třeba vzít v úvahu, že u mnohých léčiv není jejich mechanismus účinku znám, často se přitom jedná o několik rozdílných mechanismů. [10].

Přítomnost léčiv v přírodě může vést k abnormálním fyziologickým procesům a poruchám reprodukce, zvýšenému výskytu rakoviny a vývoji bakterií rezistentních vůči antibiotikům [11]. Bylo prokázáno, že mnoho léčiv vypouštěných do životního prostředí má potenciál narušovat endokrinní rovnováhu jak u vodních organismů, tak u člověka. Přibývá případů onemocnění souvisejících s poruchami endokrinního systému a nežádoucích fyziologických účinků na živočichy. Objevují se důkazy, že změny reprodukčního zdraví lidí, včetně poklesu mužské plodnosti, vrozených vad a rakoviny prsu a varlat souvisejí s působením chemikálií narušujících endokrinní systém, mezi které patří mimo jiné i léčiva [4].

Toxicita léčiv je posuzována dle standardizovaných testů a postupů na laboratorních organismech, mezi které patří vodní řasy, zooplankton, bezobratlí vodní živočichové a ryby [10]. Z bezobratlých jsou pro tyto účely používané perloočky hrotnatky (*Daphnia sp.*), které slouží jako dobré bioindikátory přítomnosti zbytkových léčiv ve vodním prostředí. Vodní obratlovci, především ryby, jsou velmi citlivé na endokrinní modulaci, což se může projevit poruchami jejich reprodukce. Ekotoxikologické účinky na ryby by neměly být podceněny, neboť některá léčiva mají tendenci akumulovat se prostřednictvím potravního řetězce [3].

Ačkoli u mnohých léčiv není pravděpodobné, že by díky své nízké koncentraci a toxicitě způsobovala letální změny vodních organismů, jejich dlouhodobé působení může vést k pozorovatelným toxickým účinkům [3]. V místech kontaminace léčiv jsou totiž vodní živočichové a rostliny vystaveny jejich působení po celý životní cyklus. Při testování akutní toxicity na řasách a perloočkách bylo navíc zjištěno, že směs farmak patřících do skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv (např. diklofenak, kyselina acetylsalicylová, ibuprofen nebo naproxen) vykazovala vysokou toxicitu, ačkoli koncentrace jednotlivých léčiv přítomných ve směsi byla natolik nízká, že by sama o sobě nevykazovala téměř žádné účinky. Zdá se, že míra toxicity léčiv je součtem toxicit jednotlivých léčiv. Bohužel zatím nebylo provedeno dostatečné množství studií zabývajících se toxicitou léčiv v jejich směsi [10].

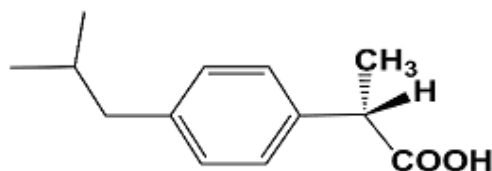
Převážná většina publikovaných dat interpretuje akutní toxicitu. Dlouhodobé působení xenobiotik, která se v přírodě vyskytují v nízkých koncentracích, sice odpovídá spíše chronickým toxicitám, jejich vyhodnocení je však velmi obtížné. Dalším problémem je skutečnost, že v odpadních vodách nejsou přítomny pouze původní molekuly léčiv, ale i jejich metabolity, u nichž jsou data ohledně toxicity nedostupná. Navíc mohou být tyto metabolity ve vodách přítomné v mnohem vyšší koncentraci než původní léčivá látka [1].

### 1.1.3 Ibuprofen

Ibuprofen (obrázek 1.2) je nesteroidní protizánětlivé léčivo patřící mezi deriváty kyseliny propanové, jehož systematický název zní (RS)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl)propanová kyselina [12]. Jakožto třetí nejpoužívanější léčivo na světě se jeho celosvětová roční spotřeba pohybuje v řádu kilotun [13].

Léčivo ibuprofen působí jako nespecifický inhibitor COX, a to COX-1 a COX-2. Tyto enzymy katalyzují přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny a tromboxany, které mohou sloužit jako intracelulární poslové působící na cílové proteiny v buňce, nebo jako tkáňové hormony. Zatímco COX-1 je zodpovědná syntézu prostaglandinů regulujících sekreci mucinu v žaludku, prostaglandiny produkované COX-2 se podílejí na regulaci krevního tlaku, rozvoji zánětu, vzniku horečky a bolesti, dále ovlivňují činnost nervového systému a proces srážení krve [14,15,16,17]. Inhibicí COX se zabrání vzniku těchto mediátorů zánětu, díky čemuž působí ibuprofen jako účinné analgetikum a antipyretikum [12].

Molekula ibuprofenu je chirální, ovšem pouze (S)-ibuprofen je aktivní v lidském těle. Ačkoli je ibuprofen jako léčivo podáván v racemické směsi, lidské enzymy snadno přeměňují (R)-ibuprofen na aktivní (S)-ibuprofen [12].



Obrázek 1.2: Struktura (S)-ibuprofenu (převzato z [www.vanderbilt.edu/vicb/discovery\\_featured1.html](http://www.vanderbilt.edu/vicb/discovery_featured1.html) 10.3.2012).

Účinná dávka ibuprofenu se pohybuje v rozmezí 600-1200 mg/den. Po orálním podání je ibuprofen velice rychle vstřebán, ze 70-80 % je vyloučen močí v původní podobě buď volný, nebo konjugovaný, zbytek pak ve formě metabolitů a jejich konjugátů. Jedná se především o hydroxylované a karboxylované produkty, konkrétně karboxyibuprofen a hydroxyibuprofen (obrázek 1.3) [12,13].

Nejvýznamnější enzymy z hlediska procesů I fáze biotransformace ibuprofenu jsou CYP2C8 a CYP2C9. Bylo zjištěno, že metabolismus ibuprofenu je stereoselektivní: zatímco CYP2C8 se účastní hydroxylace (R)-ibuprofenu, CYP2C9 metabolizuje především (S)-ibuprofen [18,19].



Obrázek 1.3: Struktura metabolitů ibuprofenu: (zleva) karboxyibuprofen, hydroxyibuprofen (převzato z [http://www.chemicalbook.com/Search\\_EN.aspx?keyword=carboxyibuprofen](http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=carboxyibuprofen) 10.3.2012 a z [http://www.chemicalbook.com/Search\\_EN.aspx?keyword=hydroxyibuprofen](http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=hydroxyibuprofen) 10.3.2012).

Na rozdíl od mnoha jiných léčiv je ibuprofen poměrně rychle a efektivně degradován v čistírnách odpadních vod, a to až z 95 % [13]. Též jeho metabolit karboxyibuprofen je



během tohoto procesu účinně likvidován; naproti tomu hydroxyibuprofen těmto degradačním procesům nepodléhá a jeho koncentrace v odtokové vodě z čistírny je téměř nezměněná [20].

Koncentrace ibuprofenu ve vzorcích z různých složek hydrosféry nacházejících se na území Německa se pohybovala v řádu ng/l. Ačkoli je S-enantiomer vylučován močí v mnohem vyšší koncentraci než R-enantiomer, je (S)-ibuprofen rychleji degradován jak v čistírně odpadních vod, tak i v povrchových vodách, což má vliv na efektivní toxicitu jednotlivých enantiomerů ibuprofenu včetně jejich možného působení na endokrinní systém [13].

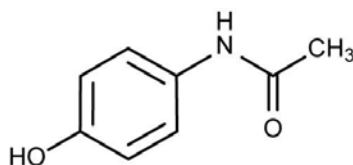
Ibuprofen patří mezi léčiva, u nichž byla prokázána chronická toxicita. Při pokusech na samicích sladkovodní ryby medaky japonské (*Oryzias latipes*), která byla po dobu šesti týdnů vystavena působení ibuprofenu o různých koncentracích, byl prokázán prudký nárůst hmotnosti jaterní tkáně spolu se zvýšenou produkcí vajíček. Zároveň poklesl počet aktivit souvisejících s námluvami a pářením. U perloočky hrotnatky velké (*Daphnia magna*) byl pozorován významný pokles velikosti populace při koncentraci léčiva 80 mg/l. Reprodukce byla narušena při všech koncentracích, při nejvyšších hodnotách byla dokonce zcela zastavena. Pokles reprodukce u sladkovodního obojživelníka blešivce obecného (*Gammarus pulex*) byl pozorován při koncentracích ibuprofenu 1 a 10 ng/l. U vodních fotosyntetizujících organismů byly pozorovány specifické účinky ibuprofenu. Zatímco růst sinice *Synechocystis sp.* byl stimulován při koncentracích léčiva v rozmezí 1-1000 µg/l, růst rostliny okřehku menšího (*Lemna minor*) byl za stejných podmínek snížen [21].

Kromě stojatých vod byl ibuprofen nalezen též v řekách a v pitné vodě, což může představovat velké nebezpečí pro zdraví lidské populace. Bohužel však zatím stále nejsou známy účinky na člověka při dlouhodobém působení tohoto léčiva [21].

#### **1.1.4 Acetaminofen**

Acetaminofen (obrázek 1.4), nazývaný též paracetamol, je užíván jako analgetikum již více než 50 let [22]. Jeho systematický název zní: N-(4-hydroxyfenyl)acetamid [23]. Acetaminofen je často řazen mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva, ačkoli v klinické praxi i při testování na zvířatech vykazuje jen velmi malé protizánětlivé účinky. Stejně jako ostatní léčiva z této skupiny však působí proti bolesti, tlumí horečku a patří mezi nejoblíbenější analgetika a antipyretika užívaná po celém světě [24], neboť má relativně málo vedlejších účinků [22].

Přestože je acetaminofen na trhu již poměrně dlouhou dobu, přesný mechanismus jeho účinku nebyl dosud zjištěn. Předpokládá se, že působí jako inhibitor COX, podle nejnovějších poznatků je vysoce selektivní vůči COX-2 [25].



Obrázek 1.4: Struktura acetaminofenu (převzato z <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---A/Acetaminophen---Paracetamol.htm> 11.3.2012).

Optimální jednorázová dávka léčiva u dospělého člověka je 0,5-1 g [23]. Acetaminofen je z 85-90 % glukuronidován nebo sulfatován na neaktivní konjugáty, které jsou močí vyloučeny z těla [23]. Menší množství léčiva je oxidováno prostřednictvím CYP na hepatotoxický N-acetyl-p-benzochinonimin a netoxický 3-hydroxyacetaminofen. Oba tyto metabolity jsou poté konjugovány s glutathionem [9]. Pouze 5 % léčiva je vyloučeno močí nezměněno [23]. Za oxidaci acetaminofenu na N-acetyl-p-benzochinonimin je zodpovědný především CYP2E1, do jisté míry se však na tomto procesu podílí i CYP1A2, CYP3A4 a CYP2A6 [26].

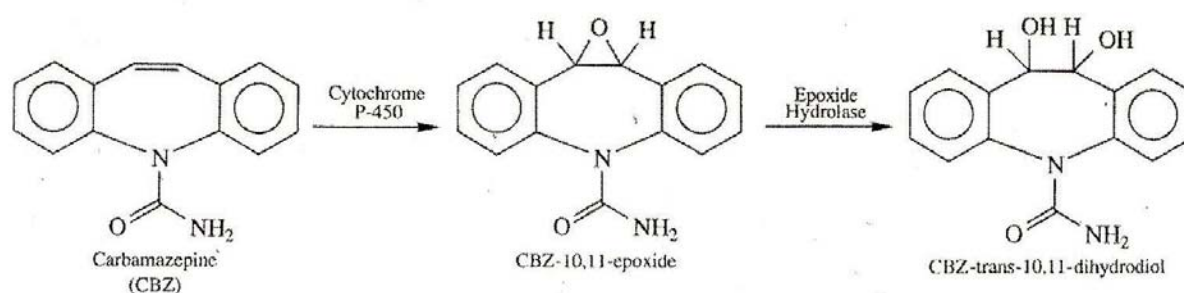
Stejně jako ibuprofen je i acetaminofen snadno odstraňován a degradován v procesu čištění odpadních vod. Při testování vzorků vody z čistíren odpadních vod na území Německa byla přítomnost acetaminofenu prokázána jen v 10 % případů [20]. Podle některých studií se koncentrace acetaminofenu v odtokové vodě ze španělských čistíren odpadních vod pohybovala mezi 20 ng/l a 4,3 µg/l. V Dunaji na území Srbska však jeho koncentrace dosahovala až 78,17 µg/l, což je mnohonásobně vyšší hodnota než předpokládaná neškodná koncentrace 9,2 µg/l. Paracetamol proto představuje potenciální nebezpečí pro vodní organismy [21].

Výzkum toxicity acetaminofenu byl prováděn na vodních řasách, perloočkách, rybích embryích, luminiscentních bakteriích a nálevnicích. Nejcitlivějším živočišným druhem na působení acetaminofenu se ukázala být perloočka hrotnatka velká (*Daphnia magna*), pro niž byla zjištěna hodnota EC<sub>50</sub> 30,1 mg/l [21].

### 1.1.5 Karbamazepin

Karbamazepin (obrázek 1.5), jehož systematický název zní 5H-dibenzo[b,f]azepin-5-karboxamid [27], je účinné antikonvulzní léčivo používané k léčbě epilepsie a v psychiatrii jako stabilizátor nálady především při terapii bipolární poruchy [28]. Karbamazepin je též indikován v případech trigeminální neuralgie, při které pacient trpí ostrou bolestí líce způsobenou mechanickým podrážděním trojklanného nervu [29].

Po jeho užití je karbamazepin oxidován prostřednictvím CYP3A4 a CYP2C8 na jeho aktivní metabolit 10,11-epoxykarbamazepin (obrázek 1.5), který má podobné antikonvulzivní účinky [28,30,31]. Tento epoxid je posléze epoxidhydrólazou štěpen na *trans*-10,11-dihydroxykarbamazepin (obrázek 1.5), který je vyloučen močí [28]. Pouze přibližně 3 % léčiva je vyloučeno močí nezměněno [32]. Charakteristickým účinkem karbamazepinu je indukce exprese CYP3A4, čímž urychluje svůj vlastní metabolismus [28,33].



Obrázek 1.5: (zleva) karbamazepin, 10,11-epoxykarbamazepin a *trans*-10,11-dihydroxykarbamazepin (převzato od Kim, E. 1988 [28]).

Účinná dávka se u dospělého člověka pohybuje v rozmezí 600-1000 mg na den v závislosti na indikaci [34]. Karbamazepin a jeho epoxid se vážou na  $\alpha$ -podjednotku napětově řízeného kanálu neuronů pro sodné ionty, čímž jej účinně blokují a zamezují tak šíření akčního potenciálu. Na tomto principu vykazuje toto léčivo požadované fyziologické účinky [33,35].

Karbamazepin je v životním prostředí takřka všudypřítomný díky jeho vysoké stabilitě. Z vody se jej v procesu čištění odpadních vod odstraní jen kolem 7 %, následkem čehož se snadno dostává do řek, navíc je velmi špatně biodegradovatelný [1,21,32]. V některých jihokorejských řekách byla naměřena koncentrace tohoto léčiva až 595 ng/l [21].

Kromě povrchových vod byl karbamazepin nalezen též v podzemních vodách, v nichž na území Německa jeho koncentrace dosahovala až 900 ng/l. Přítomnost karbamazepinu

v přírodě by proto mohla představovat reálnou hrozbu pro člověka i ostatní živočichy [21]. Jelikož je karbamazepin v přírodě velmi stálý (perzistentní), je vhodným markerem antropogenních vlivů na hydrosféru [36].

Klinické testy na vodních živočiších prokázaly vysokou toxicitu karbamazepinu. U perlooček hrotnatek (*Daphnia sp.*) byly pozorovány téměř letální změny při dlouhodobém působení léčiva o koncentraci 92 µg/l, pro sladkovodní indickou rybu dánio pruhované (*Danio rerio*) byla již letální koncentrace 43 µg/l. Samice perloočky hrotnatky obecné (*Daphnia pulex*) vystavené koncentraci 1 µg/l dosahovaly dospělosti dříve a plodily více potomků, což poukazuje na mírně stimulační účinky karbamazepinu na reprodukci. Dlouhodobé působení karbamazepinu na sladkovodního žahavce nezmara štíhlého (*Hydra attenuata*) způsobilo značný pokles v jeho přijímání potravy,  $EC_{50}$  byla pro tohoto živočicha 3,76 mg/l. Pro medaku japonskou (*Oryzias latipes*) byla hodnota  $LC_{50}$  35,4 mg/l, při stejné koncentraci byly u kaprů pozorovány strukturní změny tkáně jater, ledvin a žaber [21].

Další závažnou skutečností týkající se karbamazepinu je jeho snadná adsorbce sedimentem, čímž ohrožuje bentické i jiné organismy závislé na vodních sedimentech. Působení karbamazepinu prostřednictvím jeho přítomnosti v sedimentu na pakomára *Chironomus riparius* zamezovalo jeho zakuklení a tím i vývoji [21].

## 1.2 Fytoremediace

Fytoremediace je poměrně nově se rozvíjející technologie, která využívá fotosyntetizujících vyšších rostlin, ať už přirozených nebo geneticky vyšlechtěných, k odebírání, ukládání a detoxifikaci polutantů životního prostředí. Díky jejich fyziologii a genetické a biochemické výbavě jsou rostliny ideálním nástrojem pro remediaci půdy, sedimentu a podzemní i povrchové vody [37,38,39,40]. Kromě toho mají rostliny obrovskou kapacitu vázat organické látky ze vzduchu [41]. Fytoremediace představuje levnou a ekologickou alternativu k nešetrným remediačním metodám používaným v současnosti [37], jako je například ultrafiltrace, sorpční metody nebo odvoz zamořené půdy na jiné místo [37,42,43]. Většina poznatků ohledně fytoremediace se týká půd, lze je však aplikovat i na složky hydrosféry [44].

Speciálně vybrané nebo vyšlechtěné rostliny mohou být využity pro odstraňování toxických prvků kovů a rozmanitých organických sloučenin [41]. Zatímco elementové

polutanty, mezi které patří toxické těžké kovy a radionuklidy, jsou přirozenými biologickými procesy prostřednictvím rostliny nepřeměnitelné a jejich remediace se tak omezuje na jejich ukládání v nadzemních částech rostlin, organické nečistoty mohou být rostlinami kompletně mineralizovány [37].

Fytoremediační metody získaly během posledních let velkou podporu a uznání veřejnosti. Oproti ostatním remediačním metodám fytoremediace nenarušuje tolik životní prostředí, není zapotřebí míst k uložení odpadu, odkrývání půdy a využití těžké nákladní dopravy. Kromě toho má tato metoda potenciál likvidovat širokou škálu různých nebezpečných látek [41]. Jelikož se fytoremediace odehrává *in situ*, k obnově dané oblasti dochází již během samotného remediačního procesu [38,39].

Hlavní nevýhodou fytoremediace je dlouhá doba potřebná k odstranění polutantu z dané oblasti, v některých případech může jít až o desítky let [41,45]. Aplikace fytoremediačních metod je navíc značně limitována klimatickými a geologickými podmínkami v místech remediace, jako je nadmořská výška, teplota, typ půdy a dostupnost pro zemědělské stroje. Růst vegetace rostlin pro fytoremediaci může být omezen v závislosti na míře zamoření prostředí [41]. Ukládání cizorodých látek v rostlinách může mít toxické účinky na rostliny, což vede k selhání metody fytoremediace [45]. Metabolické přeměny organických xenobiotik rostlinami mohou vést ke zvýšení jejich rozpustnosti, což má za následek ještě větší škody na životním prostředí a migraci polutantů [41].

### **1.2.1 Rostliny jako nástroj fytoremediace organických polutantů**

Rostliny mohou přeměnit a mineralizovat velké množství komplexních organických sloučenin, což pramení z jejich schopnosti modifikovat a detoxifikovat širokou škálu organických látek a biopolymerů jakýchkoli živých organismů. Díky tomu mohou být organické nečistoty včetně léčiv rostlinami chemicky degradovány a posléze mineralizovány na neškodné, v přírodě běžně se vyskytující látky, jako je například oxid uhličitý, nitráty nebo amoniak. Napřed je však třeba polutanty efektivně extrahovat z kontaminovaných sedimentů a vody, k čemuž rostlinám výborně slouží kořenový systém díky jeho komplexní stavbě a fyziologii [37].

Rostliny z okolního prostředí velmi efektivně odebírají slabé elektrolyty a látky o průměrné lipofilitě. Zatímco velmi polární látky jen stěží prostupují skrze biomembrány a jejich odebírání rostlinou je tak značně omezeno, vysoce lipofilní sloučeniny prostupují

biomembránami velice rychle, avšak poté jsou akumulovány v kořenech, kromě toho může docházet k jejich sorpci na kořenech rostlin. Do vrchních částí rostlin jsou proto nejlépe transportovány látky o průměrné lipofilitě [45,46].

Způsob extrakce toxických organických látek z okolí prostřednictvím kořenů a jejich případného ukládání do nadzemních částí rostlin zatím není příliš prozkoumán, předpokládá se však, že se na tomto procesu do značné míry podílí aktivní transport. Existují stovky různých rostlinných transportérů, které jsou zřejmě klíčové pro fytoimediační procesy a jejichž funkce stále není objasněna. Doposud nejlépe charakterizovaný systém zahrnuje rodinu ATP-dependentních membránových pump pro glutathion-S-konjugáty. Tento systém rozeznává oxidovaný glutathion, konjugáty glutathionu s organickými látkami, konjugáty rozličných vysokomolekulárních toxických organických látek a peptid-kovových komplexů jako jsou například fytochelatiny. Ukládání a hromadění organických xenobiotik v rostlinných vakuolách umožňuje jejich následnou degradaci [37].

### 1.2.2 Metabolismus xenobiotik v rostlinách

Rostliny jsou neustále vystaveny působení různých xenobiotik včetně syntetických organických látek. Díky třífázovému detoxifikačnímu systému jsou však schopny je účinně transformovat tak, aby jim nadále neškodila [41,47]. Co se týče metabolismu xenobiotik, mají rostliny mnoho společného s živočichy, a to na úrovni metabolických drah, enzymových tříd a sekvencí cDNA [45,48]. Na rozdíl od živočišných však rostlinné izoenzymy cytochromů P450 vykazují užší substrátovou specifitu [41,49].

Absorbované cizorodé látky bývají často velmi lipofilní povahy. Aby mohly být rostlinou účinně metabolizovány, je nejprve zapotřebí jejich aktivace zvýšením rozpustnosti ve vodě. Děje se tak především oxygenací, a to prostřednictvím enzymů fáze I, kterými jsou nejčastěji peroxidasy, dále peroxygenasy a CYP. Zvýšení hydrofilních vlastností xenobiotik umožňuje ve fázi II jejich následnou konjugaci s polárními biomolekulami, jako jsou aminokyseliny, sacharidy nebo peptidy. Nejčastěji jde o konjugaci s UDP-glukosou, přičemž derivatisovaná xenobiotika mohou vystupovat jako akceptory tohoto cukru za vzniku *O*-glykosidické vazby [41,47,49].

Na rozdíl od živočichů rostliny nemohou vylučovat konjugáty xenobiotik močí. Rostlinný metabolismus xenobiotik proto zahrnuje i tzv. III fázi, během které dochází k ukládání a kompartmentaci rozpustných konjugátů do vakuol, zatímco nerozpustné

konjugáty jsou zabudovány do buněčné stěny [45]. Metabolických pochodů v rostlinných buňkách, transportu intermediátů a procesů kompartmentace se účastní například glutathion-S-transferasy, karboxyesterasy, O-glukosyltransferasy, O-malonyl-transferasy, N-glukosyltransferasy a N-malonyltransferasy [41].

### 1.2.3 Mechanismy fytořemediace

Existuje mnoho fytořemediačních mechanismů, kterými se rostliny, často za spoluúčasti mikroorganismů, podílejí na obnově kontaminovaného prostředí. Mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují extrakci organických polutantů a jejich distribuci v rostlině, patří fyzikální a chemické vlastnosti dané organické molekuly (rozpuštnost ve vodě, tlak páry, molekulová hmotnost, rozdělovací koeficient *n*-oktanol/voda), charakteristiky kontaminovaného prostředí (teplota, pH, obsah organické hmoty a vlhkosti půdy) a vlastnosti rostlin (typ kořenového systému a rostlinných enzymů) [43].

Mezi nejčastější mechanismy, díky kterým jsou rostliny schopny řemediace, patří fytoextrakce, fytoakumulace, fytostabilizace, fytotransformace/degradace, fytovolatilizace, rhizodegradace a rhizofiltrace [43].

#### 1.2.3.1 Fytoextrakce/fytoakumulace

Pojem fytoextrakce označuje proces odebrání nečistot z půdy a z podzemní a povrchové vody prostřednictvím živých rostlin. K fytoakumulaci dochází v případě, že polutant extrahovaný rostlinou není okamžitě degradován, nebo je degradován jen z části. To má za následek jeho ukládání v rostlině. Některé rostliny mají schopnost akumulovat kovy (například nikl, zinek, měď, chrom) a radionuklidy, které je možné díky tomu vytěžit z místa zamoření následným sklizením a spálením rostlin. Je-li cílem řemediace těžba polutantu, pak je žádoucí, aby rostliny vybrané pro tento účel byly schopny transportovat daný polutant z kořenů do nadzemních částí rostlin [43,50].

Obě zmíněné metody jsou obzvlášť důležité pro řemediaci prostředí zamořeného různými kovy či ionty kovů, jako je selen, těžké kovy a radionuklidy. Co se týká organických kontaminantů, podílejí se tyto metody především na odstraňování benzenu, ethylbenzenu,

toluenu, xylenů, pentachlorofenolu a alifatických organických molekul s krátkým řetězcem [43].

### 1.2.3.2 Fytostabilizace

Fytostabilizace je další metoda, která napomáhá minimalizovat migraci kontaminantů v půdách. Tento mechanismus využívá schopnosti kořenů měnit půdní podmínky, jako je pH a půdní vlhkost. Exudáty kořenů mohou způsobit precipitaci kovů a tím snížit jejich biologickou dostupnost pro ostatní rostliny přítomné v okolním prostředí. Výběrem a vypěstováním vhodné rostlinné vegetace spolu se zkvalitněním půdy je možné stabilizovat určité kontaminanty (sloučeniny kovů) v půdě a zamezit jejich interakci s živou přírodou [43].

Účinnost této metody byla prokázána v případě ošetřování těžkých kovů z těžebních odpadních nádrží a předpokládá se též pro fenoly a chlorovaná rozpouštědla [43].

### 1.2.3.3 Fytotransformace a fytodegradace

Polutanty mohou být degradovány nebo transformovány prostřednictvím rostlinných enzymů nebo kofaktorů. Jako nejvýznamnější se z tohoto hlediska jeví dehalogenasy (transformace chlorovaných látek), peroxidasy (transformace fenolických látek), nitroreduktasy (transformace výbušnin a jiných nitrovaných látek), nitrilasy (transformace aromatických látek obsahujících kyanoskupinu) a fosfatasy (transformace organofosfátových pesticidů). Rostliny jako například křen selský (*Armoracia rusticana*), brambor obecný (*Solanum tuberosum*) a ředkev setá (*Raphanus sativus*) prokázaly schopnost degradovat fenolické látky díky jejich peroxidasám [43].

### 1.2.3.4 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je mechanismus, kterým rostliny převádějí polutant do těkavé formy, čímž jej účinně odstraňují z půdy nebo vody. Rostliny mohou za spoluúčasti mikroorganismů převést selen na dimethylselenid, což je těkavá a méně toxická forma selenu. Podobným způsobem mohou některé transgenní rostliny, jako například huseniček rolní (*Arabidopsis*



*thaliana*) obsahující modifikovaný bakteriální gen *merA* kódující reduktasu rtuti, převést organické a anorganické rtuťnaté soli na těkavou, elementární formu. Využití této metody je omezeno na chlorovaná rozpouštědla, selen a rtuť [43,51].

#### **1.2.3.5 Rhizodegradace**

Rhizodegradace je biologické ošetření kontaminantů prostřednictvím zvýšené aktivity bakterií a hub v rhizosféře určitých cévnatých rostlin. Rhizosféra je zóna zvýšeného mikrobiálního výskytu a aktivity na povrchu kořenů a v jejich těsné blízkosti. Rostliny mají schopnost měnit geochemické podmínky rhizosféry, čímž zajišťují ideální prostředí pro růst bakterií a hub, které jsou schopny degradovat organické nečistoty. Odumřelé zbytky rostlin a exudáty kořenů poskytují mikroorganismům potřebné živiny, jako jsou nitráty a fosfáty, čímž odpadá potřeba aplikace cenově nákladných průmyslových hnojiv. Tuto metodu lze aplikovat při odstraňování jak těžkých kovů a radionuklidů, tak i rozličných organických molekul [43].

#### **1.2.3.6 Rhizofiltrace**

Během procesu rhizofiltrace dochází k absorpci a adsorpci polutantů z vody prostřednictvím kořenů. Touto metodou lze odstranit sloučeniny těžkých kovů a lipofilní organické molekuly z odpadních vod [41,45].

#### **1.2.3.7 Kombinované mechanismy**

Použití fytořemediace v mnoha případech zahrnuje kombinaci výše popsaných mechanismů. Například jak fytoextrakce, tak fytovolatilizace se podílejí na odstranění přebytečného selenu v půdě, přičemž oba tyto procesy probíhají s největší pravděpodobností současně. Během odstraňování trichlorethanu přítomného v podzemních vodách za použití topolů dochází k nasátí vody obsahující toto xenobiotikum rostlinou (fytoextrakce), jejímž prostřednictvím je následně degradováno (fytodegradace) [43].

#### 1.2.4 Metody aplikace fytořediačních metod

Fytořediační metody jsou nejčastěji uplatňovány *in situ*, tedy přímo v místě znečištění. Živé rostliny jsou při tom umístěny do kontaminovaných povrchových vod, půd nebo sedimentů za účelem jejich řediacce. Před započctím samotného fytořediačního procesu tedy není třeba znečištěnou půdu či vodu přemíst'ovat, díky čemuž je tato strategie po finanční stránce nejméně nákladná. Podmínkou aplikace *in situ* je však dobrá fyzická přístupnost kořenů k danému polutantu [43].

Fytořediacce *in vivo* s přemístěnou znečištěnou vodou či půdou je vhodná alternativa k výše zmíněné aplikaci v případě, že je polutant rostlinám nedostupný. Za použití mechanických prostředků je znečištěná půda či voda odebrána a dočasně přenesena na určené místo, kde je vystavena působení rostlin vybraných pro optimální ošetření daného polutantu. Po skončení tohoto procesu je očištěná půda či voda vrácena na své původní místo [43].

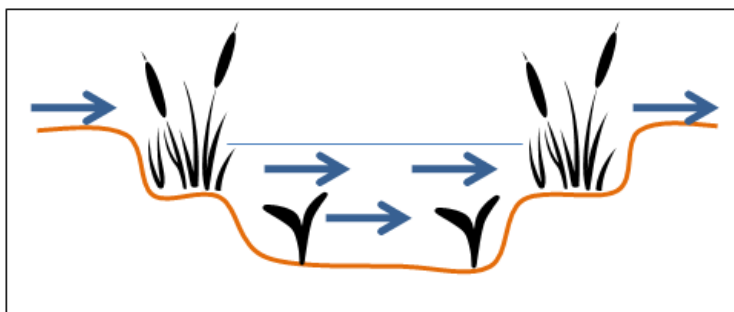
Fytořediacce *in vitro* na rozdíl od obou předchozích aplikací využívá pouze určité složky živých rostlin, jako jsou například enzymové extrakty. Tato metoda je nejčastěji uplatňována, je-li kontaminovaný materiál dočasně přemístěn na místo ošetření, jak je popsáno u fytořediacce *in vivo*. Za určitých okolností může být tento typ fytořediacce proveden *in situ*, v tomto případě jsou rostlinné extrakty přidávány do kontaminovaných vodních nádrží a mokřad. Tento přístup je finančně nejnáročnější, neboť je zapotřebí předem připravit a extrahovat dané rostlinné enzymy. Je též třeba si uvědomit, že aktivita enzymů extrahovaných z rostlin je časově omezena [43].

#### 1.2.5 Umělé mokřady

Výborné využití fytořediačních procesů představují umělé mokřady, což jsou člověkem vytvořené systémy mělkých vodních nádrží, zemních loží a příkopů s plovoucí nebo na dně zakořeněnou vegetací (ponořenou nebo vynořenou), které napomáhají v procesu čištění odpadních vod [52]. Tyto systémy jsou navrženy tak, aby zužitkovaly v přírodě běžně uplatňované pochody řediacce znečištěných složek hydrosféry prostřednictvím rostlin a mikroorganismů, a to díky kombinaci již dříve zmíněných fytořediačních mechanismů [53].

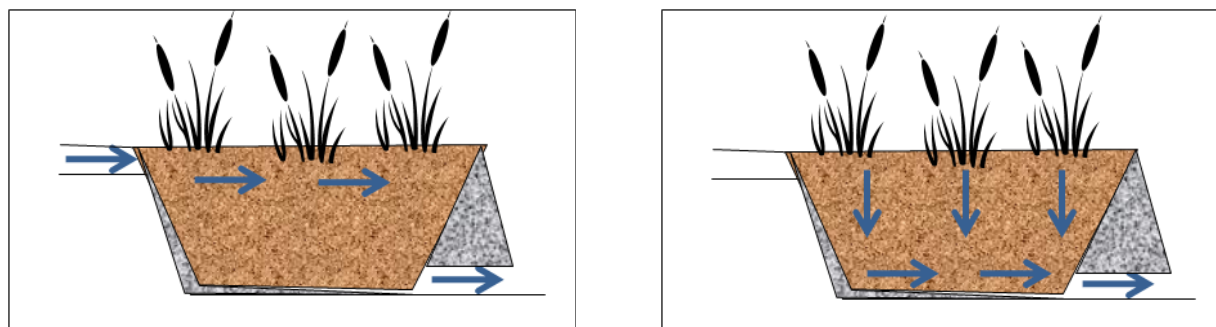
Mezi čtyři základní složky umělých mokřadů patří rostliny, půda či sediment, mikrobiální biomasa a vodná fáze obsahující chemické polutanty. Existují dvě základní

uspořádání umělých mokřadů, jejichž hlavním účelem je remediace odpadních vod, a to povrchové a podpovrchové [54]. V případě mokřadů s povrchovým tokem (obrázek 1.6) je celý systém mokřadu zaplaven odpadní vodou, takže její hladina je v kontaktu s atmosférou. Rostliny jsou vysázeny asi 120 cm pod vodní hladinou. Tento typ mokřadů je nenáročný na údržbu, je však aplikovatelný pouze na málo znečištěné vody [55,56].



Obrázek 1.6: Schéma mokřadu s povrchovým tokem (převzato od Mietto, A. 2009 [57]).

U mokřadů s podpovrchovým tokem (obrázek 1.7) je vegetace vysázena do propustného, nejčastěji štěrkového substrátu tvořícího jeho matrici, která je hluboká 90-120 cm. Odpadní voda protéká skrze tuto matrici, vodní hladina však nedosahuje k jejímu povrchu. Tento systém je schopný účinnějšího čištění, jeho konstrukce je však finančně nákladnější [55,56]. Tok odpadní vody při podpovrchovém uspořádání může být buď horizontální, nebo vertikální. U mokřadů s podpovrchovým horizontálním tokem (obrázek 1.7) proudí voda paralelně s povrchem matrice a systém je trvale udržován nasycený vodou, zatímco při vertikálním toku matrice vodou saturovaná není, neboť odpadní voda je obvykle aplikována v určitých časových intervalech a následně se vsakuje skrze matrici [54,55,56].



Obrázek 1.7: Schéma mokřadů s podpovrchovým tokem: (zleva) horizontální tok, vertikální tok (převzato od Mietto, A. 2009 [57]).

Pro účely fytořediace jsou v umělých mokřadech vysazovány makrofyty, což jsou rostliny adaptované na růst ve vodou nasycených půdách [56]. Na základě četných praktických zkušeností se ukázalo, že nejvhodnějšími makrofyty pro fytořediaci v umělých mokřadech jsou helofyty, neboli bahenní rostliny, a to díky jejich schopnosti vypořádat se s extrémními podmínkami v rizosfěře vlivem odpadních vod, jako je kyselé nebo bazické pH, přítomnost toxických polutantů nebo vznik methanu a sirovodíku [58].

Mezi nejčastější druhy rostlin, které jsou vysazované v umělých mokřadech, patří rákos obecný (*Phragmites australis*), sítina (*Juncus spp.*), skřípina (*Scirpus spp.*), orobinec úzkolistý (*Typha angustifolia*) a orobinec širokolistý (*Typha latifolia*), ale také například kosatec žlutý (*Iris pseudacorus*) pro jeho estetičnost. V posledních letech byla též testována vhodnost některých rychle rostoucích stromů jako například vrb [58].

Hlavním omezením použití umělých mokřadů pro fytořediaci odpadních vod je poměrně velká plocha mokřadu, která je potřebná pro efektivní likvidaci polutantů většího počtu obyvatel. Perspektiva umělých mokřadů je tedy v jejich využití pro sídla s menším počtem obyvatel (do dvou tisíc) nebo pro terciární ošetření malé frakce odkloněné z tradičních čistíren odpadních vod [52,59].

### 1.2.6 Výhled do budoucnosti

Ačkoli fytořediální metody nabízejí mnoho možností využití, jejich aplikace je zatím teprve v počátcích. Testování těchto metod bylo dosud prováděno především v laboratořích za relativně neměnných podmínek a během poměrně krátkého časového intervalu [43]. V praxi metoda fytořediace nejednou selhala, neboť v přírodě je na rozdíl od laboratorních podmínek přítomno mnoho stresujících faktorů, jako je například neustálá změna teploty a přísunu živin, přítomnost různých patogenů nebo nerovnoměrná distribuce polutantů [60].

I přes rostoucí zájem veřejnosti i komerčního sektoru a potvrzení úspěšnosti několika pilotními studiemi je před uvedením fytořediálních metod do praxe nejprve zapotřebí provést více experimentů základního výzkumu. Především je třeba důkladněji prozkoumat rozdíly v metabolismu u jednotlivých rostlin a lépe porozumět komplexním interakcím mezi polutanty, půdou, kořeny rostlin a mikroorganismy v rizosfěře [60]. Pro zjištění skutečného potenciálu fytořediálních metod a optimálního uspořádání systému mokřad je třeba provést též výzkum v terénu a v průběhu delšího časového intervalu [43].

Klíčovou úlohu při širším využití fytořediačních metod bude pravděpodobně hrát molekulární biologie, která umožní vývoj rostlin s vlastnostmi, které budou přesně odpovídat požadavkům jejich použití pro konkrétní účely. K tomu je však třeba odhalit geny, které jsou zodpovědné za schopnost rostliny vypořádat se s konkrétními polutanty [41,59].

### **1.3 Vliv stresových faktorů na aktivitu rostlinných enzymů**

Rostliny jsou neustále vystaveny působení různých stresových faktorů, jako je například sucho, vysoké koncentrace solí v půdě, mráz, nedostatek fosforu, železa nebo přítomnost různých patogenů, mezi které patří nejen bakterie, houby a rostlinné viry, ale též živočichové živíci se částmi rostlin. Z těchto důvodů rostliny vyvinuly řadu mechanismů, díky kterým jsou schopny se přizpůsobit nepříznivým podmínkám [61].

V souvislosti se stresovou odpovědí rostlin na různé biotické i abiotické podněty je třeba zmínit tři enzymy, jejichž aktivita bývá za daných nepříznivých podmínek zvýšena. Jedná se o PEPC, NADP-ME a PPDK. Tyto enzymy se účastní pochodů fixace oxidu uhličitého u  $C_4$  rostlin, kromě toho mají též nefotosyntetickou funkci. Vyskytují se u všech rostlin, neboť se podílejí na udržování pH a doplňují intermediáty Krebsova cyklu [61].

V následujícím textu bude nejprve popsána úloha PEPC, NADP-ME a PPDK při fotosyntetických procesech  $C_4$  rostlin a poté bude uveden přehled těchto tří enzymů z hlediska jejich nefotosyntetické funkce a významu při stresové odpovědi. V neposlední řadě bude též zmíněn význam peroxidasy při detoxifikaci cizorodých látek.

#### **1.3.1 Úloha PEPC, NADP-ME a PPDK při fotosyntetické fixaci $CO_2$ $C_4$ rostlin**

$C_4$  rostliny jsou oproti  $C_3$  rostlinám zvýhodněné za extrémních podmínek, jako jsou vysoké teploty, sucho, vysoká koncentrace solí v půdě nebo vysoká míra slunečního svitu.  $C_4$  rostliny vykazují řadu unikátních anatomických a fyziologických znaků a metabolických drah, které jim umožňují za výše zmíněných podmínek efektivněji koncentrovat  $CO_2$  v buňkách, v nichž probíhá fotosyntéza. Smyslem této adaptace je zvýšení dostupnosti  $CO_2$  pro enzym Rubisco, který jej následně zabuduje do molekuly 1,5-ribulosabisfosfátu. Díky efektivnější asimilaci  $CO_2$  prostřednictvím  $C_4$  rostlin dochází k potlačení oxygenasové funkce tohoto

enzymu, čímž je utlumen nežádoucí konkurenční proces fotorespirace, který vede ke značným ztrátám uhlíku [61,62,63].

Efektivnější asimilace je dosaženo prostorovým oddělením procesu fixace  $\text{CO}_2$  a jeho následného zabudování do molekuly 1,5-ribulosabisfosfátu enzymem Rubisco. První krok, kterým je fixace  $\text{CO}_2$ , probíhá v cytosolu mesofylových buněk prostřednictvím PEPC, který jej zabudovává do molekuly PEP za vzniku oxalacetátu [62]. Jelikož je první stabilní sloučeninou po fixaci  $\text{CO}_2$  čtyřuhlíkatá molekula, rostliny, které využívají tento mechanismus, se označují jako  $\text{C}_4$  rostliny [63].

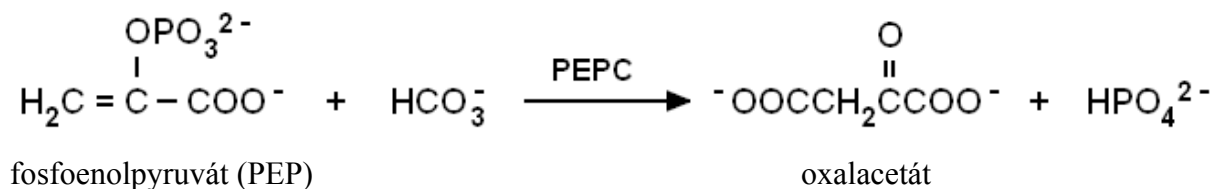
Po zabudování  $\text{CO}_2$  do molekuly PEP prostřednictvím PEPC je vznikající oxalacetát působením malátdehydrogenasy redukován za vzniku malátu. K tomuto procesu dochází v chloroplastech mesofylových buněk. Přeměna oxalacetátu může též probíhat působením jiných enzymů, například cytosolární aspartátaminotransferasy za vzniku aspartátu, a to v závislosti na typu  $\text{C}_4$  rostliny [62].

Malát a ostatní produkty redukce oxalacetátu jsou ihned po jejich vzniku transportovány do buněk pochev cévních svazků, kde podléhají dekarboxylaci za vzniku pyruvátu prostřednictvím jednoho ze tří enzymů, kterými jsou NADP-ME, NAD-ME a PEP karboxykinasa, a to opět v závislosti na typu  $\text{C}_4$  rostliny. Uvolněný  $\text{CO}_2$  je ihned asimilován enzymem Rubisco, další procesy temnostní fáze fotosyntézy již probíhají stejnými metabolickými drahami jako u  $\text{C}_3$  rostlin [62].

K uzavření celého cyklu je zapotřebí regenerace pyruvátu za vzniku PEP. Pyruvát je proto transportován zpět do chloroplastů mesofylových buněk, kde je fosforylován prostřednictvím PPDK. Při tomto ději dochází ke spotřebě ATP a vzniklý PEP přechází opět do cytosolu mesofylové buňky, kde je připraven pro další asimilaci molekuly  $\text{CO}_2$  [62].

### 1.3.2 PEPC

PEPC (EC 4.1.1.31) je cytosolický enzym přítomný ve vyšších rostlinách, řasách a mikroorganismech, nevyskytuje se však u živočichů a hub [61]. PEPC katalyzuje ireverzibilní  $\beta$ -karboxylaci PEP za přítomnosti  $\text{HCO}_3^-$  jako zdroje uhlíku a  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  iontů. Produktem této vysoce exergonické reakce je oxalacetát, přitom se uvolní fosfátový zbytek [61,64], jak je znázorněno na obrázku 1.8:



Obrázek 1.8: Rovnice karboxylace PEP prostřednictvím PEPC za vzniku oxalacetátu (nakresleno podle Buchanan, B. et al 2002 [65]).

*In vivo* se PEPC vyskytuje jako homotetramer složený z podjednotek o velikosti 100-110 kDa [66]. Aktivita různých isoform rostlinných PEPC je regulována na mnoha úrovních. Alosterickou regulaci vykazuje široká škála jak pozitivních (např. glukosa-6-fosfát), tak i negativních (např. L-malát) efektorů, obzvláště za suboptimálních podmínek (koncentrace substrátu PEP nižší než  $K_m$ , fyziologické pH). Další významný způsob regulace aktivity rostlinné PEPC představuje fosforylace konzervovaného serinového zbytku, tato reakce je katalyzována PEPC kinasou [61,67].

### 1.3.2.1 Nefotosyntetické funkce

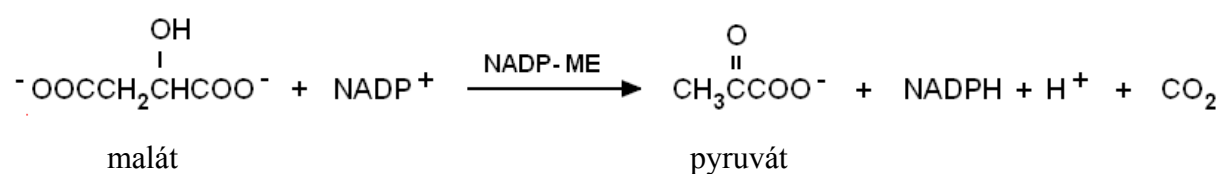
Jednou z hlavních funkcí nefotosyntetické PEPC je doplňování oxalacetátu jako intermediátu Krebsova cyklu. Dále se tento enzym účastní asimilace dusíku, biosyntézy aminokyselin a regulace pH a elektroneutrálnosti. Kromě toho se PEPC u  $C_3$  rostlin podílí na opětovném zachycení  $\text{CO}_2$ , který byl respirován [61,64].

### 1.3.2.2 Role PEPC při stresové odpovědi

Zvýšená exprese či aktivita PEPC v rostlinách byla dokumentována za různých stresujících podmínek jako je sucho, chlad, vysoká koncentrace solí v půdě, nedostatek fosforu, železa, dusíku, přítomnost nadbytku hlinitých kationtů v půdě nebo vysoká koncentrace  $\text{O}_3$  v ovzduší [61]. S ohledem na biotické stresové faktory je třeba zmínit skutečnost, že virová infekce rostlin tabáku po napadení *Y* virem bramboru nebo *A* virem bramboru vedla ke zvýšení aktivity PEPC [68,69].

### 1.3.3 NADP-ME

NADP-ME (EC 1.1.1.40) se vyskytuje u většiny živých organismů včetně prokaryotických a eukaryotických mikroorganismů, rostlin, živočichů a člověka. NADP-ME katalyzuje oxidační dekarboxylaci malátu za účasti NADP<sup>+</sup> jako koenzymu, produkty reakce jsou pyruvát, CO<sub>2</sub> a NADPH + H<sup>+</sup> (obrázek 1.9). Jako nejefektivnější kofaktory tohoto enzymu se ukázaly být Mg<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup> [61,70].



Obrázek 1.9: Rovnice dekarboxylace malátu prostřednictvím NADP-ME za vzniku pyruvátu a uvolnění CO<sub>2</sub> (nakresleno podle Rothermel, B. A. et al 1989 [70]).

Rostlinné NADP-ME jsou kódovány malou genovou rodinou, která je nejlépe prozkoumána u rýže (*Oryza L.*) a huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Expres těchto genů přitom závisí na konkrétní tkáni a vývojovém stupni rostliny. U huseníčku se vyskytují čtyři izoformy NADP-ME lišící se lokalizací a regulací. Tři z těchto izoform se vyskytují v chloroplastech a jsou inhibované prostřednictvím ATP, oxalacetátu a fumarátu. Zbývající izoforma, která se vyskytuje v cytosolu, je inhibována pouze ATP a oxalacetátem a na rozdíl od předchozích tří izoform aktivována aspartátem, fumarátem a sukcinátem [61,71].

#### 1.3.3.1 Nefotosyntetické funkce

Isoformy NADP-ME, které nemají fotosyntetickou funkci, doplňují redukované ekvivalenty NADPH do biosyntetických metabolických drah, dále pomáhají udržovat stálou hodnotu interacelulárního pH a společně s PEPC doplňují intermediáty pro různé metabolické procesy [61].



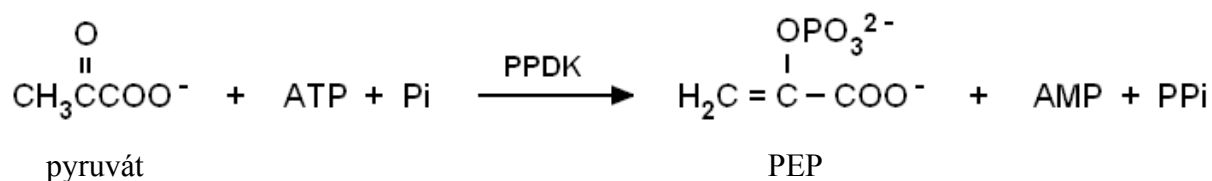
### 1.3.3.2 Role NADP-ME při stresové odpovědi

Stejně jako PEPC je i NADP-ME asociována s odpovědí rostlinného metabolismu na stres. Bylo prokázáno, že sucho, vysoká koncentrace solí v půdách a mráz zamezuje růstu rostlin a významně ovlivňuje celý rostlinný metabolismus. NADPH, který je produktem reakce katalyzované prostřednictvím NADP-ME, hraje klíčovou roli při buněčném růstu, proliferaci a detoxifikaci. Antioxidační obranné systémy jako například askorbát-glutathionový cyklus vyžadují NADPH pro ochranu rostliny před oxidačním stresem. Aktivita NADP-ME byla též zvýšena u *P. vulgaris* L. pěstovaných za přítomnosti 2 μM koncentrace CdSO<sub>4</sub> v médiu [61].

NADP-ME je indukován při biotickém stresu, neboť ten je spojen s oxidačním stresem a produkcí reaktivních kyslíkových radikálů. Tyto procesy jsou, jak už bylo dříve zmíněno, závislé na produkci NADPH a tím i na činnosti samotného NADP-ME [72,73]. Bylo prokázáno, že aktivita NADP-ME byla zvýšena při napadení rostlin tabáku *Y* virem bramboru a nadále rostla společně s rozvojem tohoto infekčního onemocnění [74].

### 1.3.4 PPK

PPDK (EC 2.7.9.1) se s výjimkou živočichů vyskytuje u rozličných organismů od bakterií a prvoků až po rostliny. Tento enzym katalyzuje reverzibilní přeměnu pyruvátu, ATP a Pi na PEP, AMP a P<sub>i</sub> [61], jak je znázorněno na obrázku 1.11:



Obrázek 1.10: Rovice fosforylace pyruvátu prostřednictvím PPK za vzniku fosfoenolpyruvátu (nakresleno podle [http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPDK\\_reaction.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPDK_reaction.svg) 31.3.2012).

U C<sub>4</sub> rostlin je aktivita PPK posttranslačně regulována reverzibilní fosforylací threoninového zbytku prostřednictvím PPK regulačního proteinu. Tato reakce je závislá na

intenzitě světla, přičemž při světelné deprivaci dochází k deaktivaci PPDK fosforylací, zatímco při vyšší míře ozáření je tento enzym aktivován defosforylací, a to opět PPDK regulačním proteinem [75,76]. PPDK regulační protein byl nalezen též u C<sub>3</sub> rostlin, kde na podobném principu reguluje aktivitu PPDK nacházející se v chloroplastech [77].

#### **1.3.4.1 Nefotosyntetické funkce**

Funkce PPDK u C<sub>3</sub> rostlin dosud není plně objasněna, a to především díky nízkému obsahu tohoto enzymu ve většině rostlinných orgánů. Největší množství PPDK je u C<sub>3</sub> rostlin obsaženo v semenech a středních žilkách listů. Předpokládá se, že v semenech tento enzym řídí metabolismus aminokyselin a biosyntézu škrobu, zatímco ve středních žilkách listů poskytuje PEP do šikimátové dráhy pro biosyntézu ligninu [75,78,79].

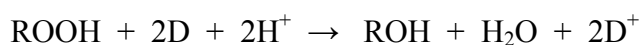
#### **1.3.4.2 Role PPDK při stresové odpovědi**

Isoformy PPDK nacházející se u C<sub>4</sub> rostlin byly zkoumány za chladu [80,81] a expozice UV záření [82], zatímco vliv stresu na PPDK vyskytujících se u C<sub>3</sub> rostlin zatím nebyl dostatečně prozkoumán [83]. Ukázalo se, že stresové faktory jako je sucho, vysoká koncentrace solí, chlad a nízká koncentrace kyslíku vedly k indukci exprese PPDK v kořenech sazenic rýže. Jelikož byla za těchto podmínek zvýšena též aktivita PEPC, předpokládá se, že přitom dochází k opětovnému zachycení respirovaného CO<sub>2</sub> a vzájemné přeměně aminokyselin [84]. Aktivita PPDK byla též zvýšena při infekci rostlin *A* virem bramboru nebo *Y* virem bramboru [69,85].

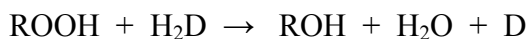
#### **1.3.5 Peroxidasy a jejich úloha při stresové odpovědi**

Peroxidasy (EC 1.11.1.7) jsou enzymy katalyzující oxidaci různých endogenních sloučenin a xenobiotik prostřednictvím peroxidu vodíku nebo organických hydroperoxidů [86,87]. Tyto enzymy mají velmi širokou substrátovou specifitu, neboť oxidují jak organické, tak i anorganické látky, nejlepšími substráty jsou však fenoly a aromatické aminy. Peroxidasy se účastní 1. fáze biotransformace jak u živočichů, tak především u rostlin, pro které je funkce

těchto enzymů při detoxifikaci xenobiotik klíčová [87]. Reakci katalyzovanou většinou peroxidas lze obecně zapsat rovnicí



kde ROOH je buď peroxid vodíku, nebo organický hydroperoxid a D je oxidovaná látka vystupující jako donor elektronů. Jeho oxidovaná forma,  $\text{D}^+$ , je často vysoce aktivním volným radikálem, který posléze může vstupovat do rozličných neenzymových reakcí včetně reakce se sebou samotným. Jestliže se reakce účastní dvouelektronový donor  $\text{H}_2\text{D}$ , lze reakci zapsat následujícím způsobem [88]:



Peroxidasy jsou nejčastěji hemoglykoproteiny, jejichž prostetickou skupinu tvoří ferriprotophyrin IX s pentakoordinovaným železitým kationtem. Existují však i peroxidasy s pozmeněným nebo dokonce chybějícím porfyrinovým skeletem, ty pak místo železa obsahují například  $\text{Mn}^{2+}$  nebo  $\text{V}^{5+}$  ionty [87].

V rostlinách jsou peroxidasy bohatě zastoupeny prakticky ve všech pletivech, a to buď volné (v cytoplasmě, vakuolách, mezibuněčném prostoru) nebo vázané (v buněčné stěně, v plasmatické membráně nebo organelových membránách). Jejich aktivita se v průběhu stárnutí rostliny zvyšuje jako reakce na stres. Další funkcí rostlinných peroxidas je regulace růstu prostřednictvím růstového hormonu auxinu, vylučování volných radikálů poškozujících membrány a účast na procesech lignifikace [87].

V rámci rostlinné peroxidasové superrodiny rozlišujeme klasické neboli sekretorické peroxidasy a askorbátové peroxidasy, které se významně liší svou primární strukturou. [86,89]. Pro peroxidasy je typické, že se vyskytují ve velkém množství forem, pravděpodobně isoenzymů, například křenová peroxidasa se vyskytuje ve čtrnácti formách [87].

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem mé práce je posouzení vhodnosti dvou vybraných zemědělských plodin, vyšlechtěných odrůd kukuřice G1 a slunečnice BELEM, jako možných rostlinných druhů pro fytoremediaci povrchových vod znečištěných vybranými druhy léčiv a jejich metabolity.

K dosažení cíle práce byly zvoleny tyto kroky:

1. Syntéza dvou lidských metabolitů antiepileptického léčiva karbamazepinu: 10,11-epoxykarbamazepin a 10,11-dihydroxykarbamazepin, a jejich následné použití jako xenobiotik při testování rostlin.
2. Kultivace sterilních *in vitro* kultur rostlin a provedení fytoextrakčních experimentů s médii obohacenými o karbamazepin a jeho metabolity 10,11-epoxykarbamazepin a 10,11-dihydroxykarbamazepin. Pro porovnání byly stejné experimenty provedeny i s acetamino-fenem a ibuprofenem.
3. Stanovení enzymové aktivity NADP-ME, PEPC a PPDK, enzymů klíčových pro metabolismus rostliny, v listech a kořenech experimentálních rostlin.
4. Stanovení enzymové aktivity peroxidasy (enzymů zodpovědných za metabolismus xenobiotik) rozpustné a nerozpustné frakce v listech a kořenech experimentálních rostlin.
5. Sledování aktivity jednotlivých isoformů NADP-ME a peroxidasy experimentálních rostlin prostřednictvím nativní elektroforézy.

## 3 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

### 3.1 Materiál

Jar, mycí prostředek na nádobí – Procter & Gamble, ČR

Savo, čistící a desinfekční prostředek – Biochemie, ČR

Semena kukuřice G1 – Monsanto, ČR

Semena slunečnice BELEM – Monsanto, ČR

### 3.2 Chemikálie

3,3'- diaminobenzidín – Sigma, USA

Acetaminofen – Sigma, USA

Acetonitril – J. T. Baker, Holandsko

ATP – Sigma, Německo

Dimethylsulfoxid – Sigma-Aldrich, Čína

Dithiothreitol – Sigma-Aldrich, Kanada

EDTA – Lachema, ČR

Fenazin methosulfát – Sigma, USA

Glukosa – Sigma-Aldrich, USA

Glycerol – Penta, ČR

Glycin – Lachema, ČR

Ibuprofen – Zentiva, ČR

Karbamazepin – Zentiva, ČR

kyselina *m*-chlorperoxybenzoová – Aldrich, Německo

kyselina trifluorooctová – Merck, Německo

Malát – Sigma, Německo

Myoinositol – Sigma, USA

Nikotinamidadenindinukleotid NADH – Sigma-Aldrich, USA

Nikotinamidadenindinukleotidfosfát NADP – Sigma-Aldrich, USA

Nitroblue tetrazolium – Sigma, USA

Oxon ( $2 \text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ ) – Sigma-Aldrich, USA

PEP – Sigma, Německo  
PVP – Sigma-Aldrich, Německo  
Pyruvát – Sigma, Německo  
Sacharosa – Penta, ČR  
TEMED – Serva, Německo  
Tris – Fluka, Německo

### 3.3 Přístroje

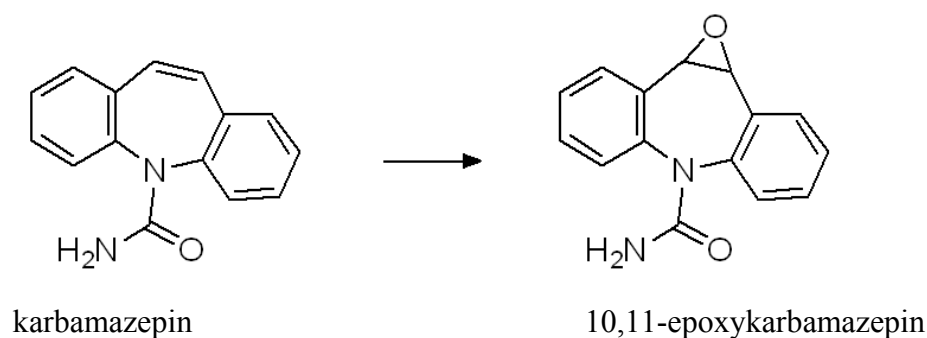
Analytické váhy 100 A – Denver Instrument Company, USA  
Centrifuga Univerzal 32 R – Hettrich, Německo  
Elektroforetická souprava Whatman – Biometra, Německo  
Hmotnostní spektrometr ESQUIRE 3000 – Bruker, Německo  
Kapalinový chromatograf – INCOS, ČR, tvořený vysokotlakým čerpadlem INCOS LPC 5020, ČR, autosamplerem INCOS LCS 5040, ČR, a UV detektorem INCOS LCS 5000, ČR  
Magnetická míchačka IKA – Labortechnik, Německo  
NMR Avance 400 MHz – Bruker, Německo  
pH-metr IQ 125 – Scientific Instruments, USA  
pH-metr Ultrabasic UB 10 – Denver Instrument Company, USA  
Předvážky WBW 2 – AE ADAM, Velká Británie  
Rotační vakuová odparka Laborata 4002 – Heidolph, Německo  
Spektrofotometr Helios  $\alpha$  – Thermo Spectronic, USA  
Spektrofotometr Spekol 11 – Carl Zeiss Jena, Německo  
Sterilní box BHSL – Labox, ČR  
Vortex V-1 plus – Biosan, Lotyšsko

## 4 METODY

### 4.1 Organická syntéza

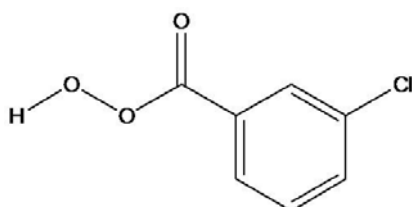
#### 4.1.1 Syntéza 10,11-epoxykarbamazepinu

Mým úkolem byla epoxidace karbamazepinu na 10,11-epoxykarbamazepin. Schéma této reakce je znázorněno na obrázku 4.1:



Obrázek 4.1: Epoxidace karbamazepinu na 10,11-epoxykarbamazepin (nakresleno podle Kim, E. 1988 [28]).

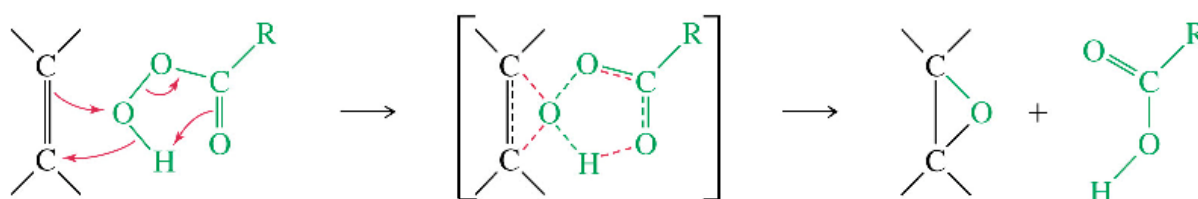
Epoxidace alkenů probíhá jako *cis*-adice atomu kyslíku na násobnou vazbu. Jako oxidační činidla jsou k tomuto účelu využívány nejčastěji peroxykyseliny. V minulosti se používaly např. kyselina peroxybenzoová, peroxymravenčí nebo peroxyoctová, kvůli jejich nízké stabilitě byly však nahrazeny *m*-chlorperoxybenzoovou kyselinou, která je dnes hojně používána díky jejímu všestrannému využití a snadné manipulaci. Tato kyselina (obrázek 4.2) je na rozdíl od výše zmíněných stálejší a lze ji používat i za zvýšené teploty (90 °C) pro oxidaci nereaktivních alkenů [90].



Obrázek 4.2: Struktura kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové (převzato z <http://wikis.lib.ncsu.edu/images/1/15/MCPBA.jpg> 29.7.2012).

Mezi další činidla používaná k epoxidaci patří oxon, který obsahuje hydrogenperoxysíran draselný jako oxidační agens. Oxon je komerčně dostupný jako trojný komplex solí, jehož chemický vzorec je  $2 \text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$  [91]. Toto činidlo je hojně využíváno díky jeho stabilitě, netoxické povaze, neznečišťujícím vedlejším produktům a cenové dostupnosti [92].

Epoxidace alkenů je stereospecifická reakce probíhající synchronním mechanismem [90]. Na obrázku 4.3 je znázorněn mechanismus epoxidace alkenu prostřednictvím peroxykyseliny:



Obrázek 4.3: Mechanismus epoxidace alkenu prostřednictvím peroxykyseliny (převzato z [http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/340/348272/Instructor\\_Resources/Chapter\\_08/Text\\_Images/FG08\\_08-05UN.JPG](http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/340/348272/Instructor_Resources/Chapter_08/Text_Images/FG08_08-05UN.JPG) 29.7.2012).

#### 4.1.1.1 Oxidace karbamazepinu prostřednictvím oxonu

K 100 mg karbamazepinu (0,42 mmol) rozpuštěném v 6 ml 60% methanolu ve vodě byly přidány dva molární ekvivalenty oxonu (516 mg, 0,84 mmol). Reakční směs, která nabyla žlutooranžovou barvu, byla míchána po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla provedena TLC chromatografie, jako mobilní fáze pro TLC byl použit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Jelikož se výchozí látka dle TLC nezměnila, byla směs byla nadále ponechána reagovat přes noc.

Po 24 hodinách byla opět provedena chromatografie na tenké vrstvě za modifikovaných podmínek, která opět neprokázala přítomnost žádného reakčního produktu.

K reakční směsi bylo přidáno 6 ml acetonitrilu a 100 mg  $\text{NaHCO}_3$  (1,19 mmol) rozpuštěného v 1 ml destilované vody. Směs, která nyní nabyla světle žlutou barvu, byla ponechána reagovat přes noc při laboratorní teplotě. Poté byla provedena TLC chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a acetoacetátu v poměru 1:1. Vznik reakčního produktu opět nebyl prokázán.



#### 4.1.1.2 Oxidace karbamazepinu prostřednictvím kyseliny peroxyoctové

Kyselina peroxyoctová byla připravena smísením 13,5 ml 30% roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,132 mol) a 4,5 ml 99% kyseliny octové (0,078 mol). Roztok byl zředěn destilovanou vodou na 50 ml, z něj byly posléze přidány 2 ml k 50 mg (0,21 mmol) karbamazepinu, směs byla promíchána a ponechána reagovat při laboratorní teplotě přes noc.

Do následujícího dne se v baňce vytvořily podlouhlé bílé krystalky. Na TLC destičku byl nanesen vzorek rozpuštěného krystalku v methanolu, jako mobilní fáze byl použit acetonitril. Prostřednictvím TLC byla nalezena nezreagovaná výchozí látka.

Baňka s reakční směsí byla umístěna do olejové lázně na magnetické míchačce a za zvýšené teploty byl její obsah míchán, dokud se krystalky nerozpustily. Poté byly přidány 4 ml acetonitrilu, směs byla zahřána k varu a do ní bylo přidáno 2,5 ml vodou ředěného roztoku kyseliny peroxyoctové. Směs byla zahřívána po dobu 5 hodin, poté byla provedena TLC chromatografie, jako mobilní fáze byl použit acetonitril. Reakční produkt opět nebyl přítomen, výchozí látka nezreagovala.

#### 4.1.1.3 Oxidace karbamazepinu prostřednictvím kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové

Na analytických vahách bylo naváženo 1,00 g karbamazepinu (4,23 mmol) a posléze rozpuštěno ve 20 ml chloroformu. K tomuto roztoku byly přidány dva molární ekvivalenty (2,24 g, 8,46 mmol) kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové rozpuštěné ve 20 ml chloroformu a směs byla pečlivě promíchána. Reakční směs byla ponechána stát přes noc při laboratorní teplotě. Následující den byla přítomnost reakčního produktu ověřena pomocí TLC chromatografie, jako mobilní fáze byl použit aceton.

Produkt reakce byl izolován a přečištěn extrakcí reakční směsi pomocí 180 ml 10% roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , reakční směs jím byla třikrát protřepána po 60 ml. Spodní, chloroformové frakce byly spojeny, poté k nim byl přidán bezvodý  $\text{MgSO}_4$  jako sušidlo a směs byla ponechána přes noc v lednici. Následující den bylo sušidlo odfiltrováno pomocí nálevky se smotkem vaty, rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce.

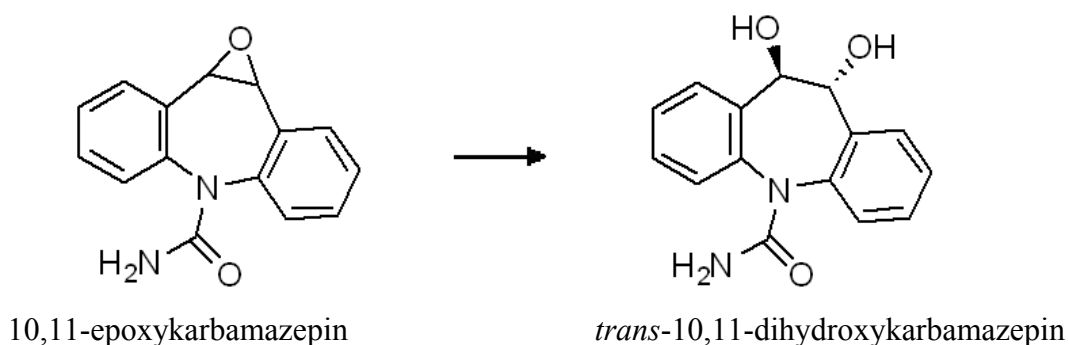
Byla provedena hmotnostní spektrometrie ESI v pozitivním modu, jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Byla potvrzena přítomnost požadovaného reakčního produktu, 10,11-epoxykarmamazepinu.

Surový produkt byl dále přečištěn sloupcovou chromatografií. Odparek byl rozpuštěn ve směsi diethyletheru a acetonu v poměru 1:1 a nanesen na silikagelovou kolonu, jejíž mobilní fází byla směs diethyletheru a acetonu v poměru 1:1. Frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na odparce.

Vzorek takto izolované látky byl rozpuštěn v  $\text{CDCl}_3$  a následně bylo změřeno  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum, které opět prokázalo 10,11-epoxykarbamazepin jako reakční produkt. Výtěžek činil 56 % (0,594 g, 2,36 mmol).

#### 4.1.2 Syntéza 10,11-dihydroxykarbamazepinu

Mým cílem bylo získat 10,11-dihydroxykarbamazepin hydrolýzou epoxidového kruhu 10,11-epoxykarbamazepinu, jak je znázorněno na obrázku 4.4:



Obrázek 4.4: Hydrolýza epoxidového kruhu 10,11-epoxykarbamazepinu za vzniku *trans*-10,11-dihydroxykarbamazepinu (nakresleno podle Kim, E. 1988 [28]).

Otevírání epoxidů lze provádět buď kyselě, nebo bazicky. Oba typy reakcí probíhají mechanismem nukleofilní substituce za vzniku *trans*-produktů [93].

Kyselé štěpení epoxidů probíhá za mírných podmínek, což je dáno pnutím epoxidového kruhu. Ve zředěných roztocích kyselin proto probíhá hydrolýza epoxidů za vzniku *trans*-1,2-diolů již za pokojové teploty. Tato reakce probíhá mechanismem  $\text{S}_\text{N}$  (nejedná se však ani o  $\text{S}_\text{N}$ -1, ani o  $\text{S}_\text{N}$ -2), k ataku epoxidu nukleofilem přitom dochází z boční strany [93].

Kromě kyselin ve vodném prostředí za vzniku  $\text{H}_3\text{O}^+$  lze k otevírání epoxidů použít i halogenovodíkové kyseliny v bezvodém prostředí, produktem reakce je v tomto případě *trans*-halogenhydrin [93].

Epoxidové kruhy jsou bázemi štěpeny stejně snadno jako kyselinami. Ačkoli je kyslík náležející etheru obvykle špatně odstupující skupinou v  $\text{S}_{\text{N}}-2$  reakci, pnutí tříčlenného kruhu způsobuje, že epoxid reaguje za zvýšené teploty s hydroxidovým aniontem [93].

#### **4.1.2.1 Otevření epoxidu prostřednictvím kyseliny chlorovodíkové**

Do baňky s 50 mg 10,11-epoxykarbamazepinu (0,21 mmol) bylo odměřeno 30 ml 3,5% vodného roztoku HCl a směs byla ponechána reagovat za míchání v olejové lázni vyhřáté na 40 °C po dobu 6 hodin. Průběh vzniku reakčního produktu byl sledován prostřednictvím TLC chromatografie, jako mobilní fáze byl použit aceton.

Roztok byl zneutralizován pevným  $\text{NaHCO}_3$  až do slabě bazického pH, poté byl vytřepán ve 20 ml  $\text{CHCl}_3$  a organická fáze byla odebrána. Vzorek organické fáze, který měl obsahovat reakční produkt, byl zanalyzován pomocí HPLC. Ukázalo se však, že tento produkt oproti očekávání do organické chloroformové fáze nepřešel, místo toho zůstal ve vodné fázi. Následně byla vodná fáze vytřepána diethyletherem, ani nyní však nepřešel reakční produkt do organické fáze. Vodná fáze s reakčním produktem byla proto přefiltrována přes filtrační papír do předem zvážené baňky a rozpouštědno (voda) bylo odpařeno na odparce.

Byla provedena hmotnostní spektrometrie ESI v pozitivním modu, jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Přítomnost požadovaného reakčního produktu však nebyla potvrzena.

#### **4.1.2.2 Otevření epoxidu prostřednictvím kyseliny trifluoroctové**

Do baňky s 50 mg 10,11-epoxykarbamazepinu (0,21 mmol) bylo odměřeno 4,5 ml destilované vody a 0,5 ml kyseliny trifluoroctové, směs byla ponechána reagovat za míchání v olejové lázni vyhřáté na 50 °C po dobu 1 hodiny. Přítomnost reakčního produktu byla prokázána pomocí TLC chromatografie, jako mobilní fáze byl použit triethylamin.

Roztok byl zneutralizován pevným  $\text{NaHCO}_3$  až do neutrálního pH, poté byl třikrát vytřepán ve 25 ml  $\text{CHCl}_3$ , organické frakce byly spojeny. Byla provedena TLC chromatografie, na destičku byl nanesen vzorek jak z vodné, tak i z organické fáze, jako

mobilní fáze byl použit triethylamin. Bylo prokázáno, že téměř všechny produkt reakce přešel do organické fáze.

Ke spojeným organickým frakcím byl přidán  $\text{MgSO}_4$  jako sušidlo, baňka byla opatřena zátkou a přes noc uložena do lednice. Následující den bylo sušidlo odfiltrováno přes smotek vaty v nálevce a rozpouštědlo ( $\text{CHCl}_3$ ) bylo odpařeno na odparce.

Byla provedena hmotnostní spektrometrie ESI v pozitivním modu, jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Požadovaný reakční produkt však nebyl ve směsi přítomen.

#### **4.1.2.3. Otevření epoxidu hydroxidem sodným**

K 15 mg 10,11-epoxykarbamazepinu (0,063 mmol) byl přidán 1 ml 10% roztoku NaOH a 0,5 ml 100% ethanolu. Směs byla za míchání a zahřívání na olejové lázni vyhřáté na 40 °C po dobu 6 hodin. Přítomnost reakčního produktu byla ověřena pomocí TLC chromatografie, jako mobilní fáze byl použit aceton.

Reakční směs byla vytřepána 10 ml diethyletheru, TLC chromatografie potvrdila, že organická fáze obsahovala reakční produkt. Rozpouštědlo (diethylether) bylo odpařeno na odparce.

Byla provedena hmotnostní spektrometrie ESI v pozitivním modu, jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Přítomnost požadovaného reakčního produktu nebyla prokázána.

#### **4.1.2.4 Otevření epoxidu ve vodě**

K 15 mg 10,11-epoxykarbamazepinu (0,063 mmol) byly přidány 3 ml destilované vody. Směs byla za míchání a zahřívání na olejové lázni vyhřáté na 90 °C ponechána reagovat po dobu 5 hodin. Přítomnost reakčního produktu byla prokázána pomocí TLC chromatografie, jako mobilní fáze byl použit aceton.

Reakční směs byla vytřepána 15 ml  $\text{CHCl}_3$ , k organické fázi byl přidán  $\text{MgSO}_4$  jako sušidlo, baňka byla opatřena zátkou a uložena přes noc do lednice. Následující den bylo sušidlo odfiltrováno přes smotek vaty v nálevce do předem zvážené baňky a rozpouštědlo ( $\text{CHCl}_3$ ) bylo odpařeno na odparce.

Byla provedena hmotnostní spektrometrie ESI v pozitivním modu, jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Reakční směs však požadovaný produkt neobsahovala.

## 4.2 Pěstování sterilních rostlin

### 4.2.1 Příprava sterilního živného média

V odměrném válci na 1 l bylo smícháno 500 ml destilované vody, 100 ml roztoku makroelementů (tabulka 1), 5 ml roztoku komplexu železa (tabulka 3) a 1 ml roztoku mikroelementů (tabulka 2). Ke směsi bylo přidáno 30,0 g sacharosy, 0,1 g myoinositolu a doplněno destilovanou vodou na objem 1 l. pH roztoku bylo upraveno 10% roztokem KOH na hodnotu 5,8-5,9.

Látka	Koncentrace [mg/l] v médiu	Koncentrace v zásobním roztoku [g/l]
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	16,5
KNO <sub>3</sub>	1900	19,0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	4,4
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	3,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,7

Tabulka 1: Složení roztoku makroelementů.

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

Tabulka 2: Složení roztoku mikroelementů.

Látka	Koncentrace [mg/l] v médiu	Koncentrace v zásobním roztoku [g/l]
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	3,73
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8	2,78

Tabulka 3: Složení roztoku komplexu železa.

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml, v nichž byly následně pěstovány rostliny, bylo pomocí injekční stříkačky odměřeno 15 ml živného roztoku, zatímco do baněk

na 100 ml, ve kterých byla uchovávána čerstvá média pro další použití, bylo odměřeno 100 ml živného roztoku. Hrdla baněk byla opatřena alobalem a sterilizována 20 minut v autoklávu.

#### **4.2.2 Sazení a pěstování sterilních rostlin**

Pro každý typ xenobiotika přidávaného k rostlinám bylo vysázeno 10 – 15 rostlin pro samotný experiment a 3 rostliny pro kontrolu. K tomuto účelu byly použity Erlenmeyerovy baňky obsahující 15 ml sterilního roztoku živného média.

Semena byla vložena do baňky se zábrusem a ponechána 30 sekund v 75% roztoku ethanolu. Poté byl ethanol odlit a k semenům bylo přidáno 50 ml 20% roztoku dezinfekčního prostředku Savo ve vodě a kapka detergentu Jar. Baňka byla opatřena uzávěrem a její obsah byl za občasného třepání ponechán sterilizovat 10 minut. Po uplynutí této doby byl roztok slit a k semenům bylo přidáno 50 ml 10% roztoku dezinfekčního prostředku Savo ve vodě, baňka byla opatřena uzávěrem a za občasného třepání byl její obsah ponechán sterilizovat 20 minut. Ve sterilním boxu bylo následně pomocí pinzety vloženo do každé Erlenmeyerovy baňky 6 semen, hrdlo bylo ihned poté uzavřeno alobalem a rostliny byly kultivovány při 26 °C a vystaveny světlu zářivek po dobu 16 hodin denně. Kukuřice byla za těchto podmínek pěstována 14 dní, zatímco slunečnici bylo třeba pěstovat tři týdny.

#### **4.2.3 Přidávání xenobiotik k rostlinám a průběh samotného experimentu**

Experiment, který trval celkem pět dní, byl vždy zahajován v pondělí, v pátek byl ukončen a byly sklizeny vzorky z kořene a listů rostlin. Nejprve byl připraven roztok daného xenobiotika v dimethylsulfoxidu o koncentraci 2 mg/ml. Poté bylo ve sterilním boxu do každé ze zásobních Erlenmeyerových baněk obsahujících 100 ml sterilního média aplikováno 0,75 ml roztoku xenobiotika (acetaminofenu, ibuprofenu, karbamazepinu nebo 10,11-epoxykarbamazepinu) v dimethylsulfoxidu, čímž bylo dosaženo jeho výsledné koncentrace v zásobním sterilním médiu 15 mg/l. Ve sterilním boxu bylo nejprve z každé Erlenmeyerovy baňky s rostlinou odlito staré médium a poté bylo přidáno 100 ml nového média s léčivem. Pomocí injekční stříkačky bylo odebráno 0,5 ml vzorku média do mikrozkušavky pro stanovení přesné výchozí koncentrace xenobiotika v médiu, hrdlo baňky bylo ihned uzavřeno alobalem. Vzorky média mikrozkušavkách byly skladovány při teplotě -20 °C.

Během následujících čtyř dnů bylo vždy po 24 hodinách z každé baňky s rostlinou, do jejíhož média bylo přidáno xenobiotikum, odebráno 0,5 ml média do mikrozkušavky pro stanovení změny koncentrace xenobiotika v médiu, tento vzorek byl zamražen a skladován při teplotě -20 °C. Pátý den, tedy v pátek, byly po odebrání vzorků média jednotlivé rostliny pečlivě vysušeny a zváženy. Následně byly odebrány od každé rostliny vzorky z kořene a listů tak, aby hmotnost každého z nich činila přibližně 1 g. Totéž bylo provedeno i s kontrolními rostlinami. Jednotlivé vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě -20 °C.

#### 4.2.4 Měření koncentrace xenobiotik v médiích pomocí HPLC

Analýzy odebraných vzorků byly provedeny na kapalinovém chromatografu na koloně o rozměru 4,4 x 250 mm se sorbentem Reprosil 100 C-18 (5µm). Podmínky eluce včetně vlnové délky pro detekci eluované látky se lišily v závislosti na stanovovaném xenobiotiku a jsou uvedeny v tabulce 4:

xenobiotikum	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Vlnová délka [nm]
ibuprofen	methanol/acetonitril/1% k.octová ve vodě (1/1:0,7 (v/v/c))	0,8	230
acetaminofen	methanol:voda (1/2 (v/v), pH 3 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ))	0,8	240
karbamazepin	methanol:voda (8/2 (v/v), 0,1% k. octová)	0,8	285
10,11-epoxy-karbamazepin	methanol:voda (6/4 (v/v), 0,1% k. octová)	0,8	225

Tabulka 4: Podmínky stanovení xenobiotik ve vzorcích média prostřednictvím HPLC.

Naměřená data byla vyhodnocena chromatografickým programem Clarity (DataApex) s automatickým přepočtem dle naměřené kalibrační závislosti s mezí detekce 0,05 mg/l.

### **4.3 Měření enzymové aktivity**

Pro každý druh rostliny a příslušný metabolit byly pro měření enzymové aktivity použity dvě trojice vzorků - z kořenů a listů, a to jak z rostlin pěstovaných v médiu s xenobiotikem, tak z kontrolních rostlin.

#### **4.3.1 Příprava extraktu ze vzorků kořene a listů**

Na analytických vahách bylo naváženo přesné množství kořenů, případně listů. Pro stanovení aktivit NADP-ME, PEPC a PPK se navážka pohybovala okolo 0,33 g, pro stanovení aktivity peroxidasy 0,5 g, zatímco pro nativní elektroforézu bylo použito přibližně 0,2 g rostlinného vzorku.

Vzorek byl homogenizován v třecí misce v trojnásobném objemovém ekvivalentu pufru A (pH = 7,8; 100mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol) vůči hmotnosti navážky. Homogenát byl nalit do mikrozkušavky a k němu bylo přidáno malé množství PVP, který váže fenolické látky. Vzorky homogenátů v mikrozkušavkách byly následně centrifugovány při teplotě 4 °C a při 15 000 RPM (16632 x g) po dobu 15 minut. Po skončení programu byl supernatant obsahující cytosolární frakci s enzymy odebrán a použit pro měření enzymové aktivity příslušných enzymů.

#### **4.3.2 Měření enzymové aktivity NADP-ME**

Pro každé měření byla připravena reakční směs o následujícím složení: 400 µl 250mM Tris-HCl pufru o pH 7,4 pro slunečnici a o pH 8,0 pro kukuřici, 100 µl 100mM roztoku malátu, 20 µl 100mM roztoku MgCl<sub>2</sub>, 20 µl 10mM roztoku NADP, 410 µl destilované vody. K celkovému objemu reakční směsi, který činil 950 µl, bylo přidáno 50 µl rostlinného extraktu a následně byla změřena změna absorbance za minutu pomocí spektrofotometru Helios α při 340 nm. Měření probíhalo celkem 5 minut a 50 sekund.



### 4.3.3 Měření enzymové aktivity PEPC

Pro každé měření byla připravena reakční směs o následujícím složení: 400  $\mu\text{l}$  250mM Tris-HCl pufru o pH 8,1, 40  $\mu\text{l}$  125mM roztoku  $\text{NaHCO}_3$ , 20  $\mu\text{l}$  100mM roztoku  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu\text{l}$  10mM roztoku NADH, 20  $\mu\text{l}$  100mM roztoku PEP, 450  $\mu\text{l}$  destilované vody. V případě extraktů z kořenů slunečnice, u nichž byla afinita PEPC vůči PEP o něco nižší, bylo třeba přidat dvojnásobné množství substrátu, tedy 40  $\mu\text{l}$  100mM roztoku PEP, destilované vody bylo v tomto případě přidáno pouze 430  $\mu\text{l}$ . K celkovému objemu reakční směsi, který činil 950  $\mu\text{l}$ , bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  rostlinného extraktu a následně byla změřena změna absorbance za minutu pomocí spektrofotometru He $\lambda$ ios  $\alpha$  při 340 nm. Měření probíhalo celkem 5 minut a 50 sekund.

### 4.3.4 Měření enzymové aktivity PPK

Pro každé měření byla připravena reakční směs o následujícím složení: 400  $\mu\text{l}$  250mM Tris-HCl pufru o pH 8,1, 100  $\mu\text{l}$  100mM roztoku  $\text{MgCl}_2$ , 40  $\mu\text{l}$  125mM roztoku  $\text{NaHCO}_3$ , 20  $\mu\text{l}$  100mM roztoku pyruvátu, 20  $\mu\text{l}$  50mM roztoku ATP, 20  $\mu\text{l}$  100mM roztoku  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20  $\mu\text{l}$  10mM roztoku NADH, 330  $\mu\text{l}$  destilované vody. K celkovému objemu reakční směsi, který činil 950  $\mu\text{l}$ , bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  rostlinného extraktu a následně byla změřena změna absorbance za minutu pomocí spektrofotometru He $\lambda$ ios  $\alpha$  při 340 nm. Měření probíhalo celkem 5 minut a 50 sekund.

### 4.3.5 Měření enzymové aktivity peroxidasy

Vzorky pro měření aktivity peroxidasy byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 4.3.1. Enzymová aktivita peroxidasy byla stanovována jak z cytosolární frakce (supernatant), tak z pelety.

Z mikroskopické pelety získané po centrifugaci původního rostlinného homogenátu byly odlity zbytky supernatantu (cytosolární frakce), peleta byla promyta 1 ml pufru A a poté k ní bylo přidáno 1,5 ml 1M roztoku NaCl v pufru A (58,44 g na 1 l). Peleta byla v roztoku pečlivě rozmíchána pomocí Vortexu a následně byla centrifugována při teplotě 4 °C a při 15 000 RPM (16632 x g) po dobu 15 minut.

K 0,01 g 3,3'- diaminobenzidinu jako substrátu pro enzymatickou reakci bylo přidáno 2,5 ml 95% ethanolu, 7 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,0 a 0,1 ml 30% roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Roztok byl doplněn 0,1M fosfátovým pufrem o pH 7,0 na objem 10 ml a poté byl přefiltrován do kádinky.

Pro každé měření byla připravena reakční směs o následujícím složení: 0,5 ml destilované vody, 0,4 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,0, 0,1 ml extraktu a 0,25 ml roztoku substrátu. Extrakt bylo třeba ředit 10x nebo 20x pomocí 0,1M fosfátového pufru o pH 7,0 v závislosti na typu rostliny, rostlinného vzorku a extraktu. Enzymová aktivita peroxidasy byla měřena pomocí spektrofotometru Spekol 11 při 430 nm po dobu 5 minut, změna absorbance byla zaznamenávána po 10 s.

## **4.4 Elektroforetické metody: nativní elektroforéza**

### **4.4.1 Příprava gelu pro elektroforézu**

Pro nativní elektroforézu byl připraven polyakrylamidový separační gel o gradientu 6-12 %, zaostřovací gel byl 3%. K tomuto účelu byly nejprve připraveny tři gely o potřebných koncentracích, a to následujícím způsobem:

- 1) 6% separační gel byl připraven smísením 1 ml 30% směsi akrylamidu/Bis, 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pufru o pH 8,8, 50 µl 10% glycerolu, 4 µl TEMED, 50 µl 10% peroxidisíranu amonného a 2,6 ml destilované vody; celkový objem činil 5,004 ml.
- 2) 12% separační gel byl připraven smísením 2 ml 30% směsi akrylamidu/Bis, 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pufru o pH 8,8, 50 µl 10% glycerolu, 2 µl TEMED, 50 µl 10% peroxidisíranu amonného a 1,6 ml destilované vody; celkový objem činil 5,002 ml.
- 3) 3% zaostřovací gel byl připraven smísením 400 µl 30% směsi akrylamidu/Bis, 500 µl 1,0M Tris-HCl pufru o pH 6,8, 40 µl 10% glycerolu, 8 µl TEMED, 40 µl 10% peroxidisíranu amonného a 3 ml destilované vody; celkový objem činil 3,988 ml.

6% a 12% polyakrylamidové gely byly následně smíchány v mísiči gradientu a výsledný gel byl nalit mezi elektroforetická skla. Po jeho ztuhnutí byl navrch přidán 3%

polyakryl-amidový gel, do něj pak vložen hřeben. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut a souprava byla připravena pro elektroforézu.

#### **4.4.2 Příprava vzorků a podmínky elektroforézy**

Vzorky pro elektroforetické stanovení byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 4.3.1. Z odebraného supernatantu bylo odměřeno 150  $\mu$ l do mikrozkušavky s 30 mg sacharosy, po jejím rozpuštění bylo 20  $\mu$ l této směsi aplikováno do jamky zaostřovacího gelu. Po aplikaci všech vzorků byla spuštěna elektroforéza. Počáteční napětí bylo nastaveno na 70 mV, poté, co čelo se vzorky doputovalo do gradientového gelu, bylo napětí zvýšeno na 140 mV.

#### **4.4.3 Detekce NADP-ME a peroxidas v gelu**

Pro NADP-ME byla připravena detekční směs o celkovém objemu 20 ml obsahující 8 ml Tris-HCl pufru o pH 7,4 pro slunečnici a 8,0 pro kukuřici, 2 ml 100mM roztoku malátu, 400  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 400  $\mu$ l NADP a 8,2 ml destilované vody. Roztok byl nalit do Petriho misky o průměru 15 cm, byly přidány 2 ml barvicí směsi obsahující 0,02 g Nitroblue tetrazolium a 50  $\mu$ g Phenazin methosulfate a roztok byl pečlivě zamíchán.

Pro peroxidasy byla připravena detekční směs obsahující 0,02 g 3,3'-diaminobenzidinu, 5 ml 95% ethanolu, 14 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,0, 0,2 ml 30% roztoku  $H_2O_2$ , směs byla doplněna na objem 20 ml 0,1M fosfátovým pufrem o pH 7,0. Takto připravený roztok byl přefiltrován a nalit do Petriho misky o průměru 15 cm.

Gely byly opatrně vyjmuty ze skel aparatury pro elektroforézu a vloženy do detekčních směsí. Zatímco pro detekci peroxidas byla dostačující doba pro barvení 1-2 hodiny, pro stanovení NADP-ME musely být gely v detekční směsi ponechány přes noc. Po vyjmutí z detekční směsi byly gely krátce ponechány v Petriho misce s destilovanou vodou k jejich promytí, poté byly umístěny na fólii a skenovány.

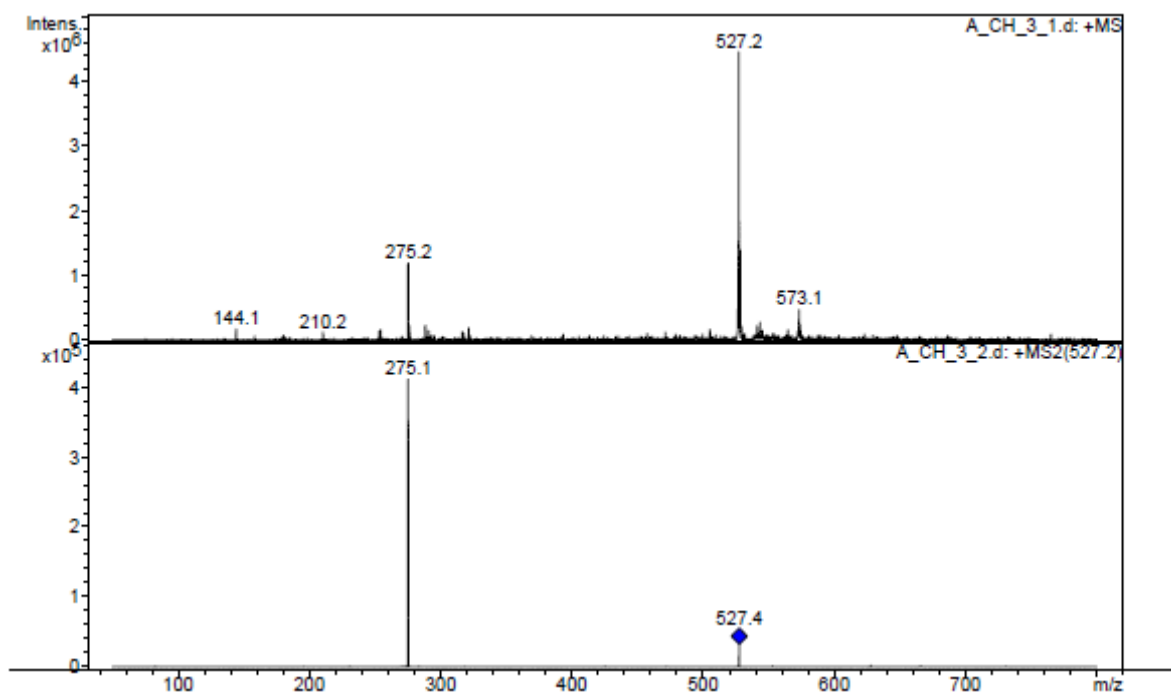
## 5 VÝSLEDKY

V rámci organické experimentální části mé diplomové práce se mi podařilo připravit a charakterizovat metabolit karbamazepinu, 10,11-epoxykarbamazepin. V případě syntézy 10,11-dihydroxykarbamazepinu nebyly běžné metody otevření oxiranového kruhu úspěšné. V rámci biochemické části byla tato látka, stejně jako ibuprofen, acetaminofen a karbamazepin, přidávána do média slunečnice BELEM a kukuřice G1. Z extraktů z listů a kořenů těchto rostlin byla následně spektrofotometricky stanovována aktivita NADP-ME, PEPC, PPK a dále peroxidasy v rozpustné a vázané frakci. Kromě toho byla sledována aktivita a počet jednotlivých isoformů NADP-ME a peroxidasy ve vázané frakci prostřednictvím nativní elektroforézy. Výsledky jednotlivých dílčích experimentů jsou popsány v následujícím textu.

### 5.1 Organická syntéza

#### 5.1.1 Syntéza 10,11-epoxykarbamazepinu

Pro syntézu 10,11-epoxykarbamazepinu epoxidací dvojnásobné vazby karbamazepinu byl použit oxon, kyselina peroxyoctová a kyselina *m*-chlorperoxybenzoová. Syntéza 10,11-epoxykarbamazepinu byla provedena úspěšně pouze při použití kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové, která je dnes, jak již bylo zmíněno dříve, pro peroxidaci používaná mnohem častěji než jiné peroxykyseliny, a to především díky její vyšší stabilitě a reaktivitě. Výtěžek produktu reakce, kterým byla světle žlutá, krystalická látka, činil 56 % (0,594 g, 2,36 mmol). Níže uvedené hmotnostní spektrum ESI v pozitivním modu dokládá úspěšnou syntézu 10,11-epoxykarbamazepinu.



Obrázek 5.1: Hmotnostní spektrum 10,11-epoxykarbamazepinu, metoda ESI v pozitivním modu.

Relativní molekulová hmotnost 10,11-epoxykarbamazepinu činí 252,2. Při použití metody ESI v pozitivním modu odpovídá molekulovému iontu signál o hodnotě 275,2  $m/z$ , neboť je molekula 10,11-epoxykarbamazepinu asociována s kationem sodíku  $\text{Na}^+$  ( $M_r = 22,99$ ). Tento pík je dobře viditelný v horním spektru na obrázku 5.1, avšak jeho intenzita je relativně nízká oproti nejvyššímu píku o hodnotě 527,2  $m/z$ . Tento pík odpovídá dimeru 10,11-epoxykarbamazepinu, s nímž je opět asociován kation sodíku. Tato skutečnost byla prokázána opětovnou fragmentací izolovaného iontu o hodnotě 527,2  $m/z$ , neboť hodnota signálu nejvyššího píku činila 275,2  $m/z$  (spodní část obrázku 5.1).

Též prostřednictvím NMR spektroskopie se podařilo identifikovat 10,11-epoxykarbamazepin, neboť se počet jednotlivých typů píků a jejich intenzita až na drobné rozdíly v hodnotách chemický posunů  $\delta$  v  $^{13}\text{C}$  spektru shodovaly s údaji v literatuře [94]. Výsledky všech spektrálních analýz jsou ve stručnosti uvedeny v následujícím přehledu:

MS (ESI+) 275,2  $(M+1)^+ + \text{Na}^+$

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 4,28 (singlet), 4,67 (široký singlet), 7,34 (multiplet), 7,42 (multiplet), 7,50 (doublet,  $J = 7,50$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 58,5 (CH), 128,3 (CH), 130,1 (CH), 130,4 (CH), 131,4 (CH), 131,6 (C), 138,2 (C), 157,8 (C).

### **5.1.2 Syntéza 10,11-dihydroxykarbamazepinu**

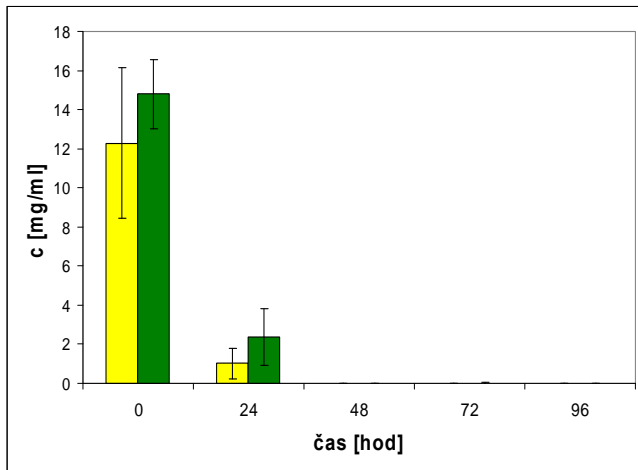
Otevírání epoxidového kruhu 10,11-epoxykarbamazepinu bylo prováděno jak kyselé prostřednictvím kyseliny chlorovodíkové a kyseliny trifluoroctové, tak i bazicky pomocí hydroxidu sodného. Při dalším pokusu bylo štěpení epoxidového kruhu této látky prováděno pouze ve vodném prostředí za zvýšené teploty. Požadovaný produkt, kterým byl 10,11-dihydroxykarbamazepin, se však žádným z uvedených způsobů připravit nepodařilo, příslušná hmotnostní spektra ESI v pozitivním modu neprokázala jeho přítomnost [95].

## **5.2 Pěstování sterilních rostlin**

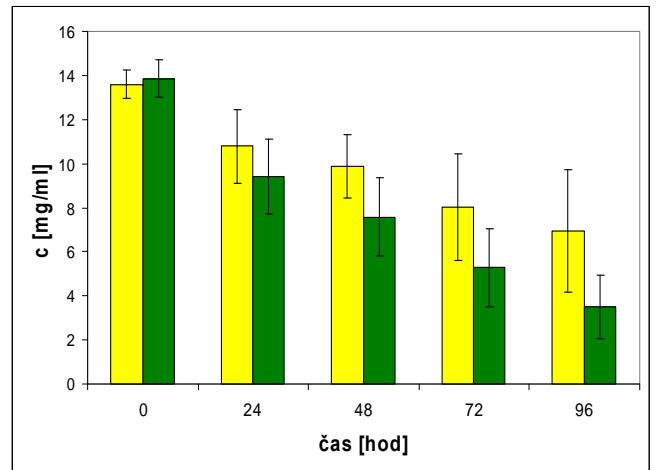
Pro testování vlivu léčiv a jejich metabolitů na růst rostlin a aktivitu vybraných rostlinných enzymů byla použita slunečnice odrůdy BELEM a odrůda kukuřice G1. K těmto rostlinám, pěstovaným ve sterilním prostředí, byl přidáván karbamazepin a jeho metabolit 10,11-epoxykarbamazepin. Stejně experimenty byly provedeny i s ibuprofenem a acetaminofenem, které jsou díky jejich vyšší polaritě rostlinami dobře přijímány a slouží proto jako standardy pro porovnání experimentů s ostatními xenobiotiky. Jelikož se nepodařilo úspěšně syntetizovat další metabolit karbamazepinu, 10,11-dihydroxykarbamazepin, byla tato látka oproti dřívějšímu plánu z dalších experimentů vypuštěna. Po dobu následujících pěti dnů byly z médií jednotlivých rostlin odebírány vzorky, z nichž byla později stanovována koncentrace příslušného xenobiotika v médiu.

### **5.2.1 Sledování úbytku koncentrace xenobiotika v médiu rostlin**

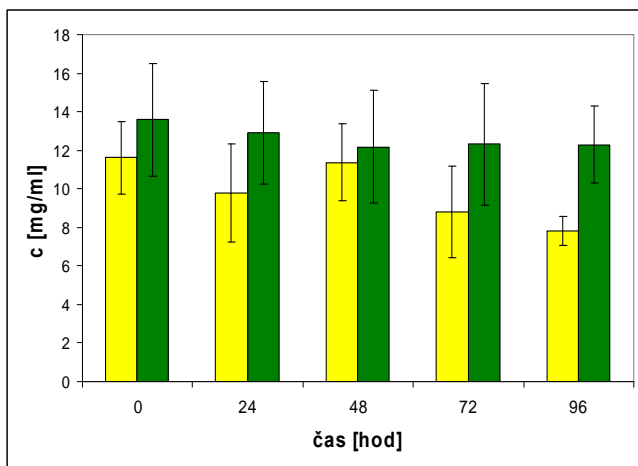
Změna koncentrace xenobiotika v médiu indikovala, do jaké míry je rostlina schopná tuto látku ukládat do svých pletiv. Pokud koncentrace léčiva či metabolitu v médiu klesala rychle, rostlina byla schopna tuto látku do svých pletiv efektivně ukládat. Nízký úbytek xenobiotika naopak poukazoval na nepřijímání této látky rostlinou. Hodnoty koncentrace příslušných xenobiotik v čase byly vyneseny do grafu, směrodatné odchylky byly počítány z 10 vzorků.



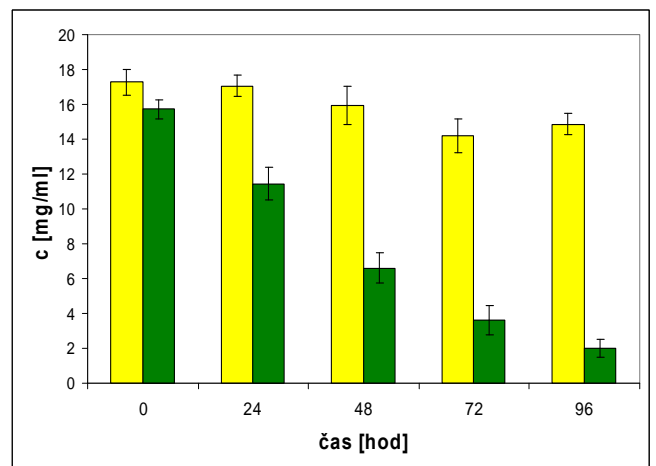
(a)



(b)



(c)



(d)

Obrázek 5.2: Průměrná koncentrace ibuprofenu (a), acetaminofenu (b), karbamazepinu (c), a 10,11-epoxykarbamazepinu (d) v médiu slunečnice BELEM (žlutá) a kukuřice G1 (zelená) v závislosti na čase.

Z obrázku 5.2 (a) je patrné, že ibuprofen byl ukládán do rostlinných pletiv slunečnice i kukuřice velice rychle a efektivně, již po 48 hodinách nebyl ve vzorcích média detekovatelný. Jak slunečnice, tak i kukuřice odebíraly ibuprofen z média přibližně stejně efektivně.

Acetaminofen byl oběma rostlinnými druhy též dobře odebíráán, jeho koncentrace v médiu klesala přibližně lineárně. Po 96 hodinách od počátku experimentu (přidání xenobiotika do média) byl však acetaminofen v obou případech stále přítomen v médiu – u slunečnice jej zůstalo 50 % a u kukuřice 25 % z původního množství. V tomto případě tedy kukuřice odebírala tuto léčivou látku z média rychleji a efektivněji než slunečnice.

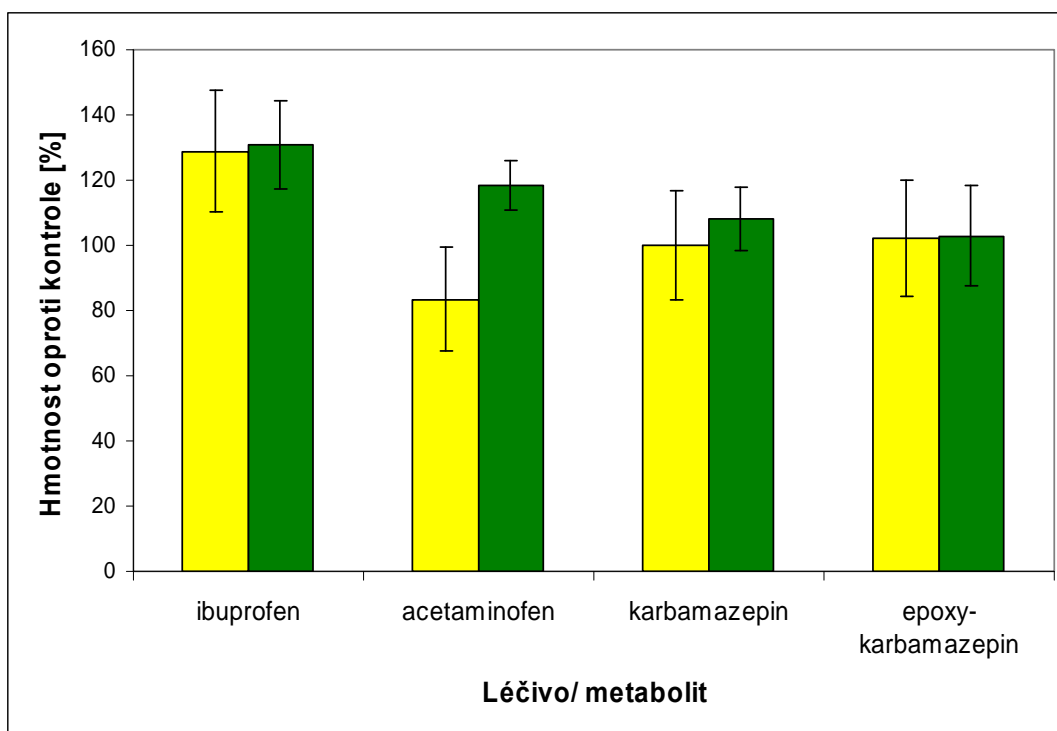
Oproti předchozím dvěma experimentům byl karbamazepin rostlinami odebírán z média velmi neochotně. Hodnoty koncentrace karbamazepinu v médiu slunečnice značně kolísaly, po 96 hodinách od počátku experimentu byla v médiu přítomno 70 % z původně aplikovaného množství tohoto xenobiotika. Kukuřice odebírala karbamazepin z média ještě hůře než slunečnice, jeho koncentrace v médiu po 96 hodinách od aplikace klesla jen o 10 %.

V případě 10,11-epoxykarbamazepinu se schopnost obou rostlin ukládat tuto látku do svých pletiv značně lišila. Zatímco kukuřice odebírala 10,11-epoxykarbamazepin z média poměrně ochotně a jeho koncentrace v médiu po celou dobu experimentu lineárně klesala, slunečnice odebírala toto xenobiotikum velmi neochotně. Koncentrace 10,11-epoxykarbamazepinu v médiu slunečnice klesala velmi málo, po uplynutí 96 hodin od počátku experimentu, zbylo v médiu asi 85 % původně přidané látky. Naproti tomu v médiu kukuřice zůstalo po 96 hodinách od počátku experimentu jen kolem 12 % z původně přidaného 10,11-epoxykarbamazepinu.

### **5.2.2 Stanovení hmotnosti rostlin**

Po skončení experimentů byly jednotlivé rostliny vysušeny a zváženy, a to jak rostliny použité pro samotný experiment, tak kontrolní rostliny. Průměrné hmotnosti rostlin pro jednotlivé experimenty byly vyneseny do grafu (obrázek 5.3) v procentech oproti kontrolnímu stanovení. Směrodatné odchylky byly počítány z 10 vzorků.





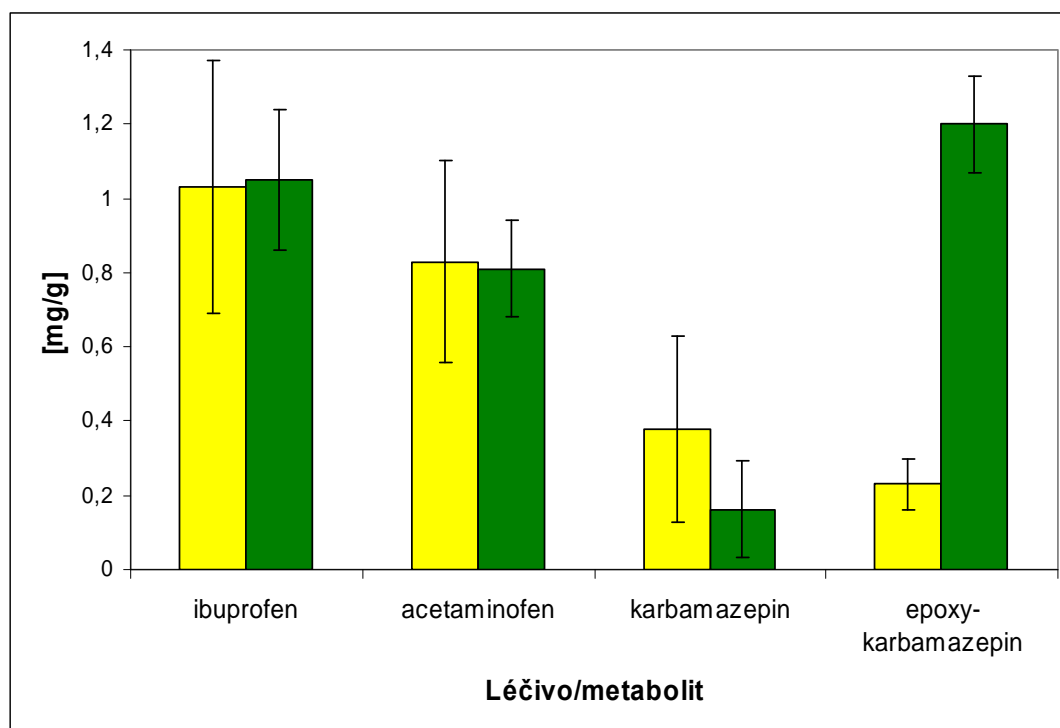
Obrázek 5.3: Průměrná hmotnost rostlin slunečnice BELEM (žlutá) a kukuřice G1 (zelená) pro jednotlivé experimenty s xenobiotiky, vyjádřená v procentech oproti kontrolním kusům.

Z obrázku 5.3 je patrné, že největší stimulační vliv na růst slunečnice BELEM měl ibuprofen, neboť průměrná hmotnost rostlin vystavených jeho působení v médiu byla o téměř 30 % vyšší než u kontrolních rostlin. Naproti tomu změna hmotnosti rostlin slunečnice po působení karbamazepinu a 10,11-epoxykarbamazepinu byla zanedbatelná. Acetaminofen výrazně snižoval růst rostlin slunečnice, a to téměř o 20 %.

Všechna použitá xenobiotika měla pro růst rostlin kukuřice G1 stimulační vliv, byť v některých případech jen nepatrný. Největší nárůst hmotnosti kukuřice opět vykazovalo působení ibuprofenu v médiu, a to přibližně o 30 %, což je hodnota velmi blízká hodnotě nárůstu hmotnosti slunečnice BELEM po působení stejné látky. Na rozdíl od slunečnice BELEM byl růst kukuřice G1 působením acetaminofenu výrazně stimulován, a to o 20 % oproti kontrolním rostlinám. Hmotnost rostlin pěstovaných v přítomnosti karbamazepinu byla jen o 10 % vyšší než u kontrolní skupiny, zatímco hmotnost rostlin pěstovaných v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu se oproti kontrolním rostlinám prakticky nelišila.

### 5.2.3 Stanovení množství xenobiotik uložených do pletiv rostlin

Do následujícího grafu (obrázek 5.4) je vyneseno množství xenobiotika, které byla rostlina schopna uložit do svých pletiv za 96 hodin experimentu, vztažené na 1 g této rostliny. Směrodatné odchylky jsou počítány z 10 vzorků.



Obrázek 5.4: Průměrné množství xenobiotika v mg, které je daná rostlina - slunečnice BELEM (žlutá) či kukuřice G1 (zelená) - schopna uložit do svých pletiv, vztažená na 1 g této rostliny.

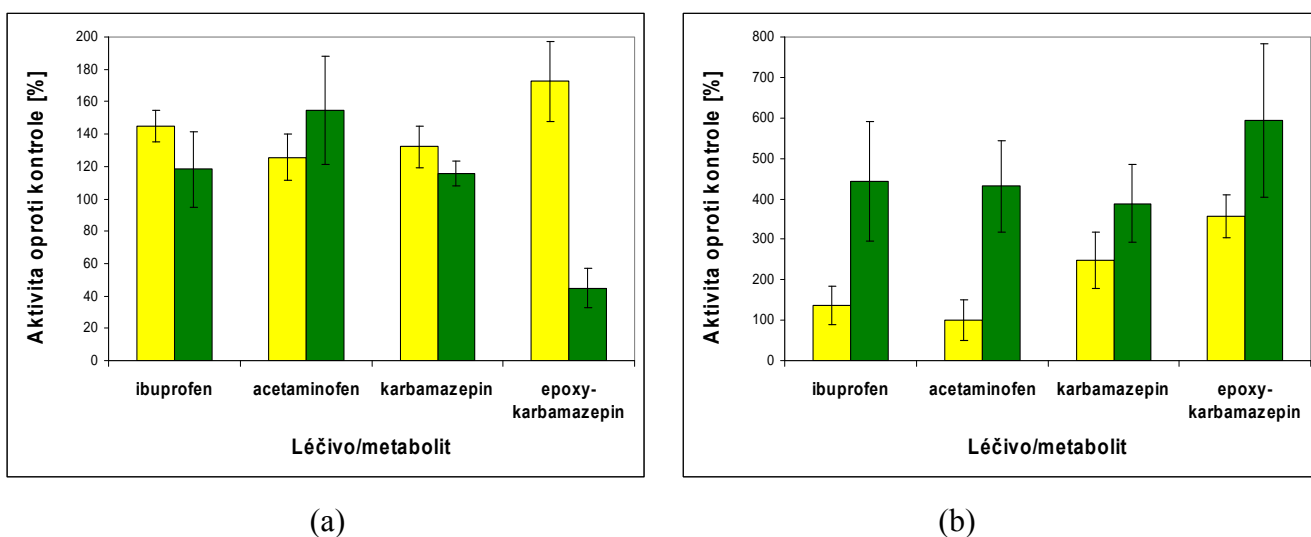
Z obrázku je zřejmé, že jak slunečnice, tak kukuřice byly schopny velmi efektivně ukládat ibuprofen a acetaminofen do svých pletiv. Obě tyto rostliny navíc prokázaly přibližně stejnou schopnost ukládat tato léčiva. Naproti tomu karbamazepin byl oběma rostlinami ukládán do pletiv velice neochotně, přičemž slunečnice prokázala lepší schopnost odebírat jej z média než kukuřice. Zatímco slunečnice vykazovala jen malou schopnost ukládání 10,11-epoxykarbamazepinu do svých pletiv, kukuřice jej ukládala velice efektivně, dokonce lépe než ibuprofen a acetaminofen.

### 5.3 Měření aktivity NADP-ME, PEPC, PPK a peroxidas v rozpustné a vázané frakci

Bylo provedeno měření enzymové aktivity NADP-ME, PEPC, PPK a peroxidas ze vzorků listů a kořenů příslušných rostlinných druhů – slunečnice BELEM a kukuřice G1. Změny hodnot enzymové aktivity vzorků rostlin vystavených působení xenobiotika oproti kontrolním rostlinám vypovídaly o míře stresové odpovědi rostliny na přítomnost xenobiotika v médiu.

#### 5.3.1 Měření aktivity NADP-ME

Do následujících grafů byly vyneseny hodnoty enzymové aktivity NADP-ME vyjádřené v procentech oproti kontrolním stanovením. Směrodatné odchylky byly počítány z 3 stanovení.



Obrázek 5.5: Enzymová aktivita NADP-ME v listech (a) a kořenech (b) slunečnice BELEM (žlutá) a kukuřice G1 (zelená), vyjádřená v procentech oproti kontrole.

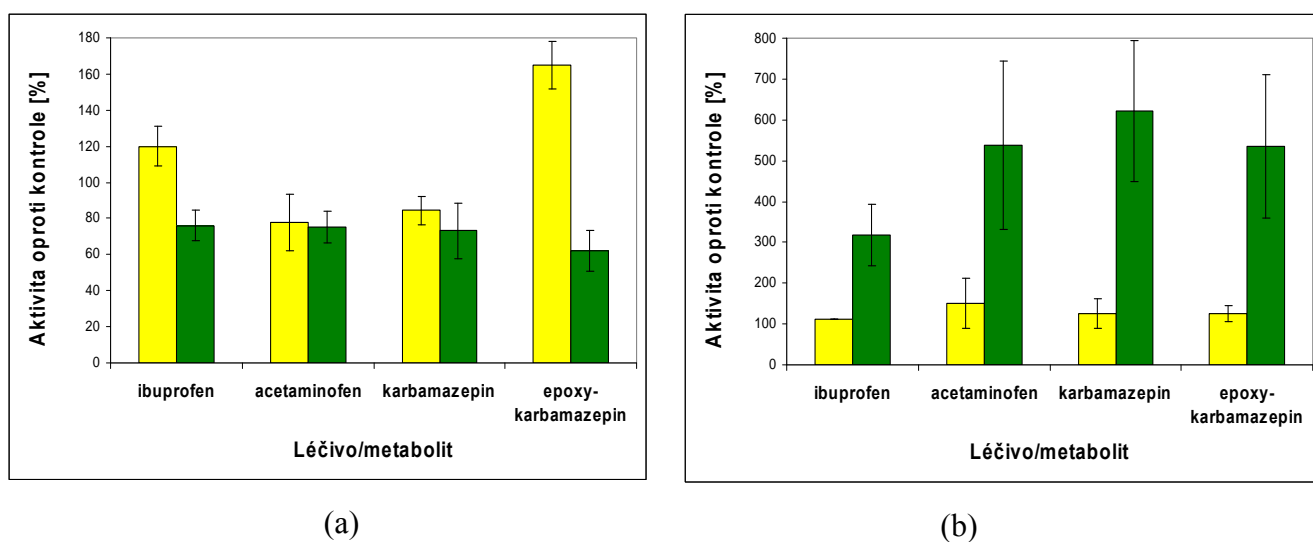
Z obrázku 5.5 (a) je patrné, že přítomnost xenobiotik v médiu měla na aktivitu NADP-ME v listech kukuřice i slunečnice stimulační vliv. Jedinou výjimkou byl v tomto případě extrakt z listu kukuřice pěstované v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu, v němž byla

aktivita NADP-ME oproti kontrolnímu stanovení nižší o téměř 60 %. Ve většině případů (ibuprofen, karbamazepin, 10,11-epoxykarbamazepin) byla aktivita NADP-ME oproti kontrole zvýšena ve slunečnici o něco více než v kukuřici, pouze acetaminofen způsoboval vyšší nárůst aktivity NADP-ME v listech kukuřice oproti kontrole, než v listech slunečnice.

V případě extraktů z kořenů byl nárůst aktivity NADP-ME o mnoho vyšší v kukuřici než ve slunečnici, jak plyne z obrázku 5.5 (b). Aktivita NADP-ME v kořenech kukuřice byla zhruba o 300-500 % vyšší než u kontrolního stanovení, přičemž nejvíce stimuloval aktivitu tohoto enzymu 10,11-epoxykarbamazepin. V extraktech z kořene slunečnice byla aktivita NADP-ME oproti kontrole zvýšena nejvíce v rostlinách pěstovaných v médiu s 10,11-epoxykarbamazepinem a dále v rostlinách pěstovaných v médiu s karbamazepinem.

### 5.3.2 Měření aktivity PEPC

Do následujících grafů byly vyneseny hodnoty enzymové aktivity PEPC vyjádřené v procentech oproti kontrolním stanovením. Směrodatné odchylky byly počítány z 3 stanovení.



Obrázek 5.6: Enzymová aktivita PEPC v listech (a) a kořenech (b) slunečnice BELEM (žlutá) a kukuřice G1 (zelená), vyjádřená v procentech oproti kontrole.

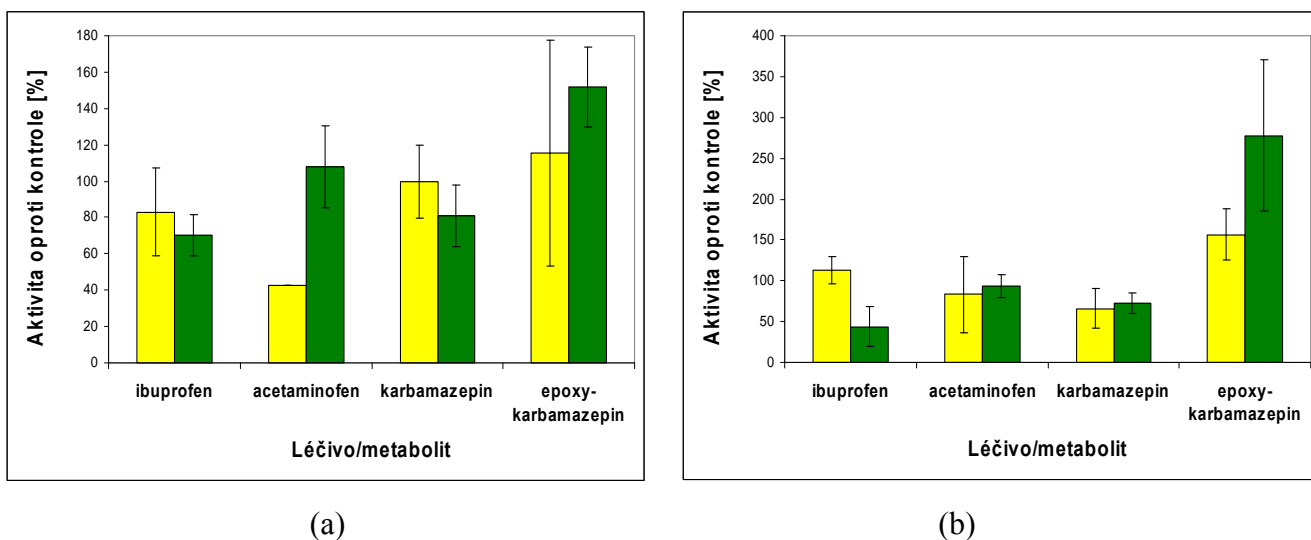
Jak je patrné z obrázku 5.6 (a), kromě extraktů z listů slunečnice pěstované v přítomnosti ibuprofenu a 10,11-epoxykarbamazepinu, v nichž byla aktivita PEPC oproti

kontrolním vzorkům stimulována, došlo v ostatních případech k poklesu aktivity PEPC oproti kontrole. Pokles aktivity tohoto enzymu byl patrný především v kukuřici. Ve většině případů se aktivita PEPC snížila přibližně o 15-25 %, v extraktu z listu kukuřice pěstované v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu dokonce téměř o 40 %.

Z obrázku 5.6 (b) je jasně vidět, že přítomnost xenobiotik v médiu stimulovala aktivitu PEPC v kořenech kukuřice mnohonásobně více než v kořenech slunečnice. Nejvyšší aktivity dosahovala PEPC v extraktu z kořene kukuřice pěstované v přítomnosti karbamazepinu, dále v přítomnosti acetaminofenu a 10,11-epoxykarbamazepinu.

### 5.3.3 Měření aktivity PPK

Do následujících grafů byly vyneseny hodnoty enzymové aktivity PPK vyjádřené v procentech oproti kontrolním stanovením. Směrodatné odchylky byly počítány z 3 stanovení.



Obrázek 5.7: Enzymová aktivita PPK v listech (a) a kořenech (b) slunečnice BELEM (žlutá) a kukuřice G1 (zelená), vyjádřená v procentech oproti kontrole.

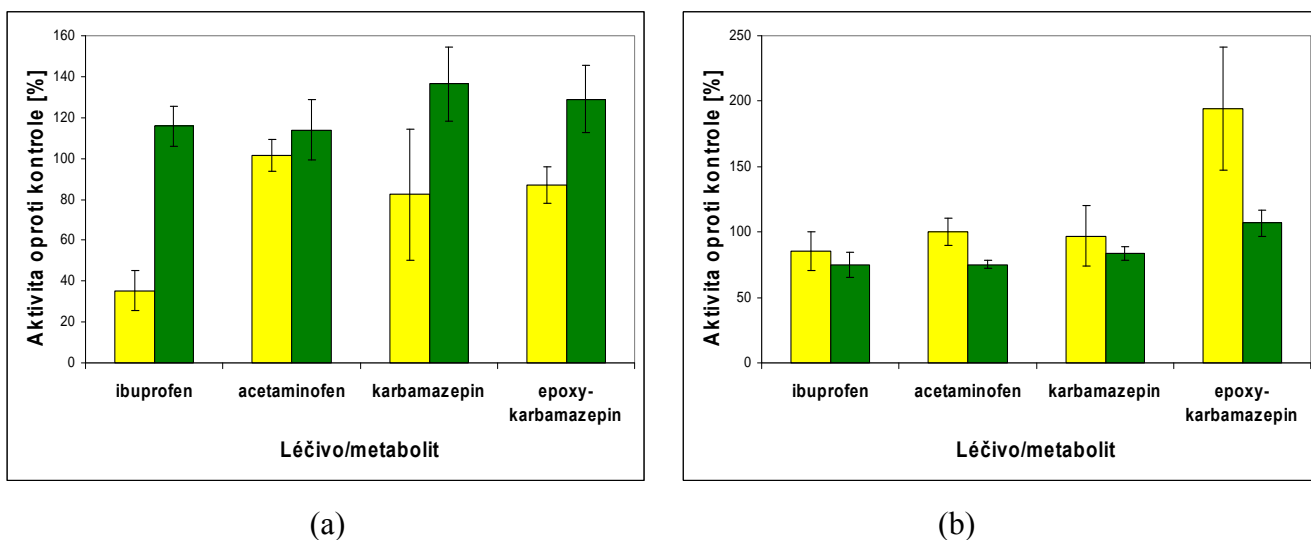
Jak ilustruje obrázek 5.7 (a), v případě extraktů z listů byl významný nárůst aktivity PPK pozorován pouze v rostlinách pěstovaných v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu, přičemž byl tento nárůst o 40 % v kukuřici než ve slunečnici. Při ostatních pokusech docházelo vesměs k poklesu aktivity PPK, v případě listů slunečnice pěstované

v přítomnosti acetaminofenu byl tento pokles téměř 60%. V listech kukuřice vystavené působení acetaminofenu byl pozorován malý nárůst aktivity tohoto enzymu. Aktivita PPDK v listech slunečnice vystavené působení karbamazepinu zůstala oproti kontrole nezměněna.

Z obrázku 5.7 (b) je patrné, že při pokusech s kořeny rostlin došlo k vysokému nárůstu aktivity PPDK pouze v případě rostlin pěstovaných v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu, přičemž tento nárůst byl o téměř 200 % vyšší v kukuřici než ve slunečnici. Při pokusech s ostatními xenobiotiky došlo k poklesu aktivity v kořenech rostlin oproti kontrole, pouze v kořenech slunečnice došlo po působení ibuprofenu k mírnému zvýšení aktivity PPDK.

### 5.3.4 Měření aktivity peroxidasy v rozpustné frakci

Do následujících grafů byly vyneseny hodnoty enzymové aktivity peroxidasy v rozpustné frakci, vyjádřené v procentech oproti kontrolním stanovením. Směrodatné odchylky byly počítány z 3 stanovení.



Obrázek 5.8: Enzymová aktivita peroxidasy rozpustné frakce v listech (a) a kořenech (b) slunečnice BELEM (žlutá) a kukuřice G1 (zelená), vyjádřené v procentech oproti kontrole.

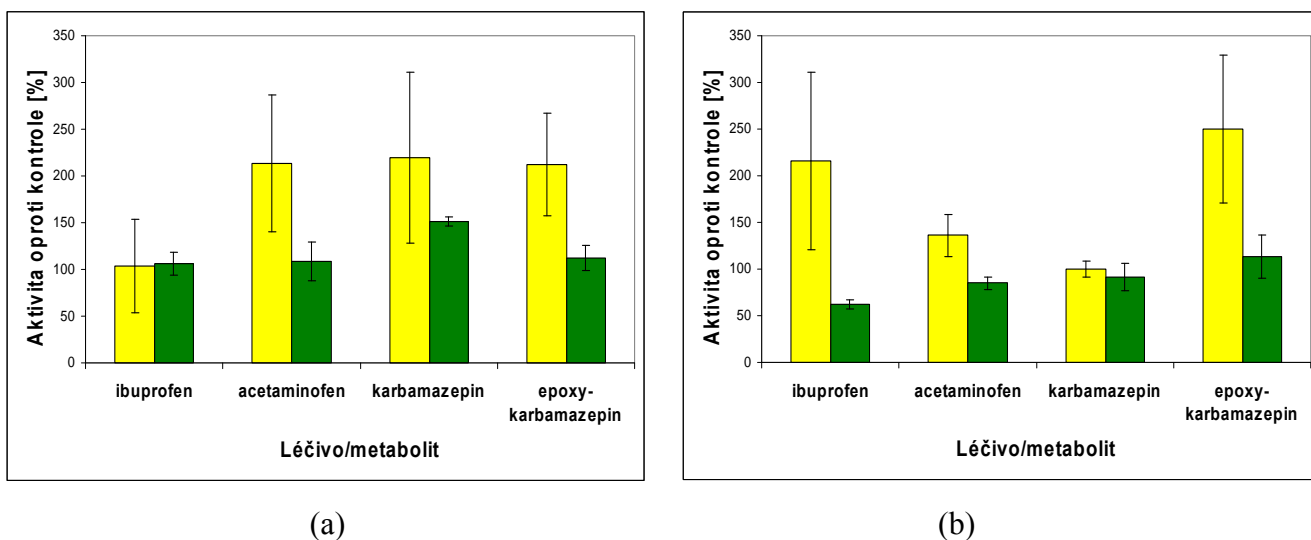
Z obrázku 5.8 (a) je zřejmé, že všechna xenobiotika způsobovala nárůst aktivity peroxidasy v rozpustné frakci v listech kukuřice, a to až o téměř 40 % při použití karbamazepinu. Naproti tomu v listech slunečnice došlo k poklesu aktivity těchto enzymů v rostlinách pěstovaných v přítomnosti ibuprofenu, karbamazepinu a 10,11-epoxykarbama-

zepinu. V případě ibuprofenu klesla aktivita peroxidas rozpustné frakce o více než 60 % oproti kontrole. Pouze v případě použití acetaminofenu se aktivita těchto peroxidas v listech slunečnice oproti kontrolnímu stanovení téměř nezměnila.

Při pokusech s kořeny byl pozorován výrazný nárůst aktivity peroxidas v rozpustné frakci oproti kontrole pouze v kukuřici pěstované v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu, a to o téměř 100 %, jak dokládá obrázek 5.8 (b). V extraktech z kořenů rostlin pěstovaných v přítomnosti ostatních xenobiotik byl většinou pozorován pokles aktivity peroxidas rozpustné frakce oproti kontrole, který byl výraznější v kukuřici.

### 5.3.5 Měření aktivity peroxidas ve vázané frakci

Do následujících grafů byly vyneseny hodnoty enzymové aktivity vázaných peroxidas vyjádřené v procentech oproti kontrolním stanovením. Směrodatné odchylky byly počítány z 3 stanovení.



Obrázek 5.9: Enzymová aktivita peroxidas vázané frakce v listech (a) a kořenech (b) slunečnice BELEM (žlutá) a kukuřice G1 (zelená), vyjádřená v procentech oproti kontrole.

Jak je patrné z obrázku 5.9 (a), v extraktech z listů slunečnice pěstované v přítomnosti všech xenobiotik s výjimkou ibuprofenu byl pozorován nárůst aktivity vázaných peroxidas oproti kontrole, a to o více než 100 %. V listech kukuřice působil pouze 10,11-epoxykarbamazepin výrazný, přibližně 50% nárůst aktivity vázaných peroxidas oproti

kontrolle. Ve všech ostatních případech zůstala aktivita těchto peroxidáz ve srovnání s kontrolním stanovením nezměněna.

V kořenech slunečnice (obrázek 5.9 (b)) došlo k nejvyššímu nárůstu aktivity vázaných peroxidáz oproti kontrole v případě 10,11-epoxykarbamazepinu (o téměř 150 %) a dále ibuprofenu (o více než 100 %) a acetaminofenu (o téměř 50 %). V kořenech kukuřice naopak došlo k poklesu aktivity vázaných peroxidáz, což bylo nejvíce patrné u ibuprofenu. Pouze 10,11-epoxykarbamazepin v malé míře zvyšoval aktivitu těchto peroxidáz v kořenech kukuřice oproti kontrolnímu stanovení.

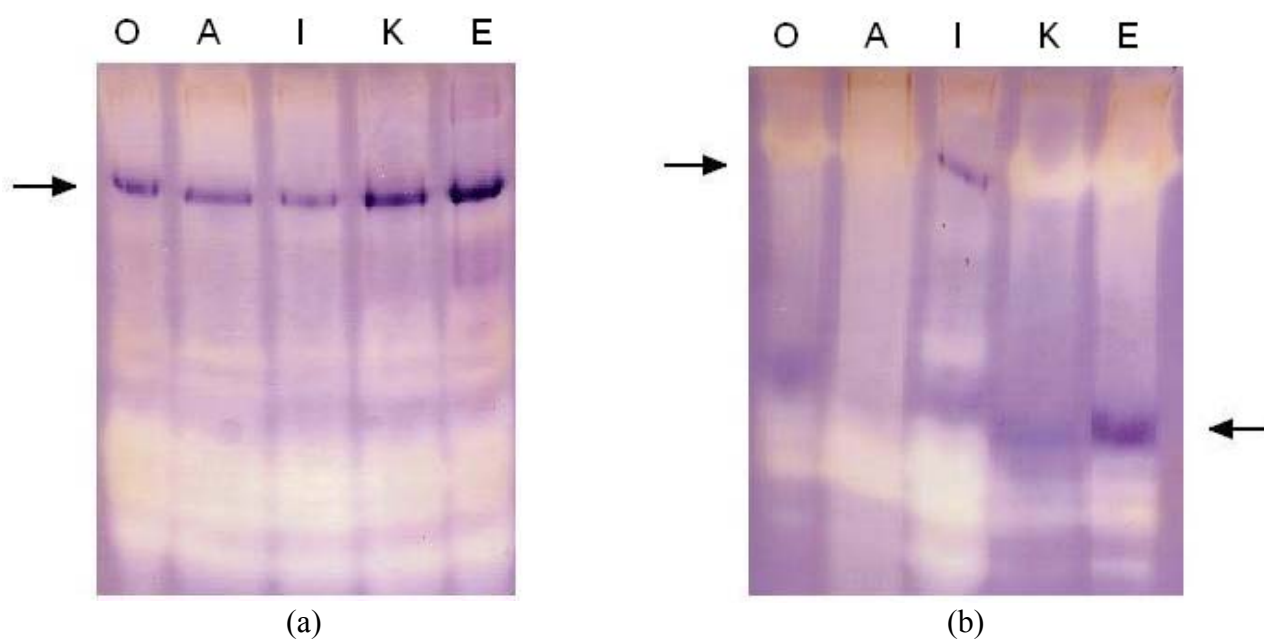
## **5.4 Elektroforetické metody: nativní elektroforéza**

Prostřednictvím nativní elektroforézy se podařilo prokázat přítomnost NADP-ME a peroxidáz v extraktech z kořenů a listů slunečnice BELEM a kukuřice G1. Síla jednotlivých proužků koreluje s aktivitou daného enzymu v rostlinném extraktu, zatímco počet proužků udává počet jednotlivých isoformů příslušného enzymu. Výsledky experimentu jsou znázorněny prostřednictvím elektroforeogramů.

### **5.4.1 Detekce NADP-ME v gelu**

Následující dva elektroforeogramy ukazují detekci enzymu NADP-ME v extraktech z listů a kořenů slunečnice BELEM:



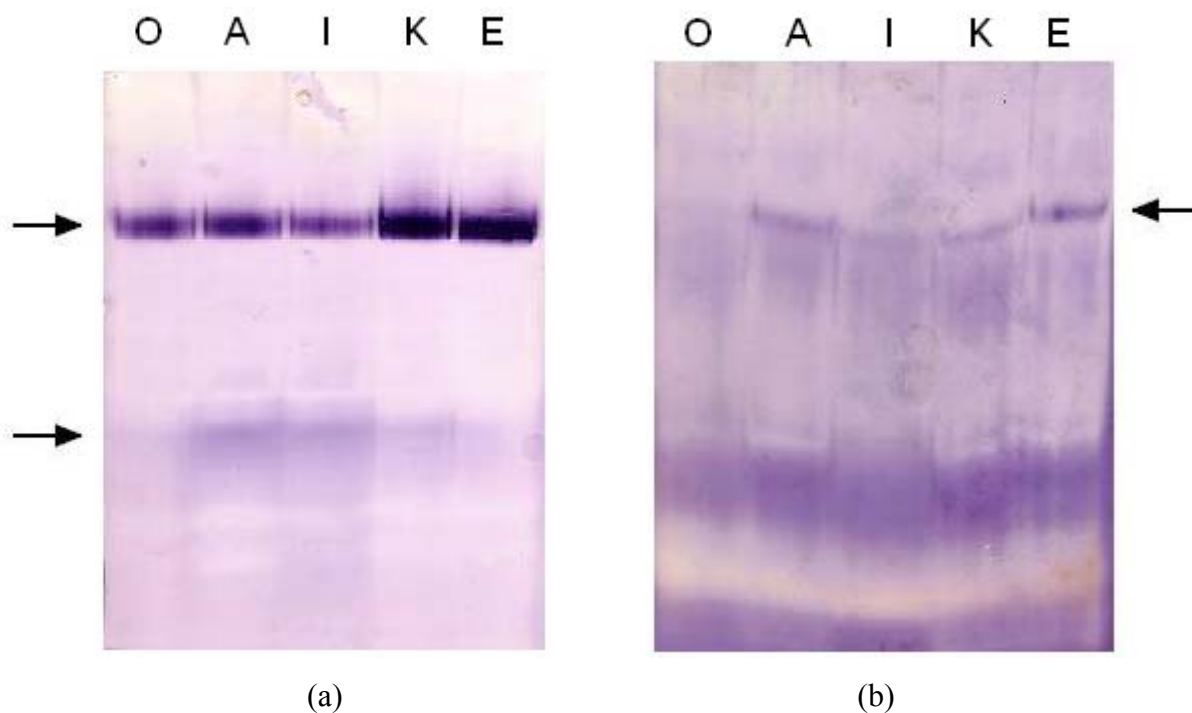


Obrázek 5.10: Detekce NADP-ME v gelu po elektroforetické separaci extraktů z listů (a) a kořenů (b) slunečnice BELEM. Označení extraktů: O – bez xenobiotika (kontrolní stanovení), A – acetaminofen, I – ibuprofen, K – karbamazepin, E – 10,11-epoxykarmazepin.

Na elektroforeogramu extraktů z listů slunečnice (obrázek 5.10 (a)) je patrná jediná isoforma NADP-ME nacházející se v jeho horní části, jak ukazuje šipka. Nejsilnější jsou proužky v extraktech z listů slunečnice pěstované v přítomnosti karbamazepinu a 10,11-epoxykarmazepinu.

Obrázek 5.10 (b) znázorňuje elektroforeogram kořenů slunečnice. V horní části elektroforeogramu se vyskytuje pouze jeden slabý proužek náležející extraktu z kořene slunečnice pěstované v přítomnosti ibuprofenu. V dolní části se pak nachází výrazný proužek v extraktu z kořene slunečnice pěstované v přítomnosti 10,11-epoxykarmazepinu a velmi slabé proužky v extraktech z kořenů slunečnice pěstované v přítomnosti ibuprofenu, karbamazepinu a dále v extraktu kontrolního stanovení. Co se týká proužků v horní a spodní části elektroforeogramu, jde o dvě různé isoformy tohoto enzymu.

Následující dva elektroforeogramy ukazují detekci enzymu NADP-ME v extraktech z listů a kořenů kukuřice G1:



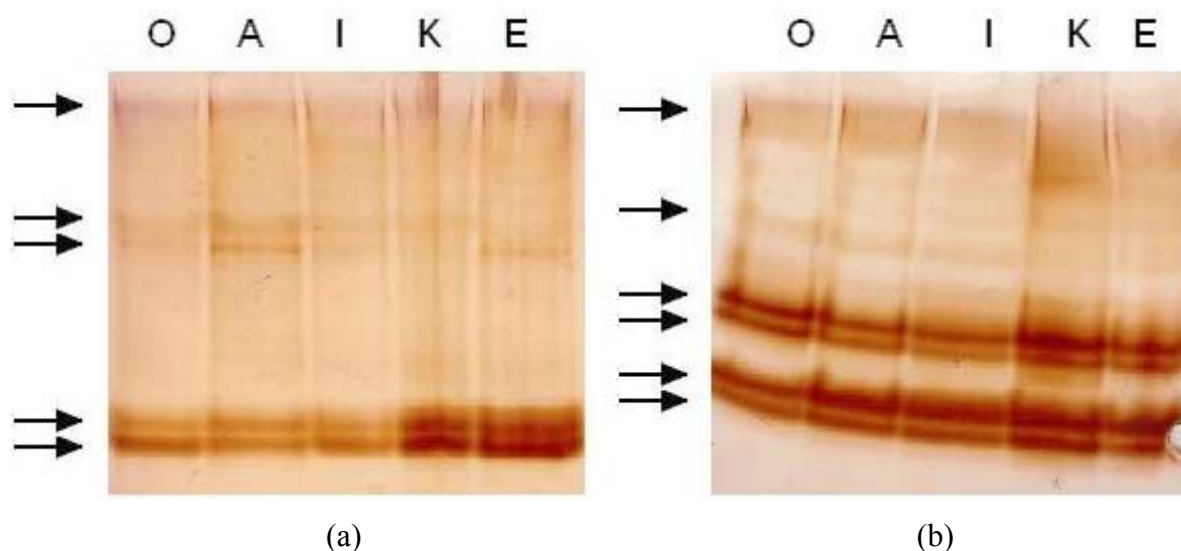
Obrázek 5.11: Detekce NADP-ME v gelu po elektroforetické separaci extraktů z listů (a) a kořenů (b) kukuřice G1. Označení extraktů: O – bez xenobiotika (kontrolní stanovení), A – acetaminofen, I – ibuprofen, K – karbamazepin, E – 10,11-epoxykarmazepin.

Obrázek 5.11 (a) ukazuje velmi výrazné proužky v horní části elektroforeogramu v extraktech z listů kukuřice. Jejich intenzita je stejně jako u slunečnice nejvýraznější v extraktech z listů rostlin pěstovaných v přítomnosti karbamazepinu a 10,11-epoxykarmazepinu, nejslabší se zdá být proužek v extraktu z listů kukuřice pěstované v médiu s ibuprofenem. Na témže elektroforeogramu se o něco níže nachází slabé a málo ohraničené proužky, které jsou nejsilnější v extraktech z listů kukuřice pěstované v přítomnosti acetaminofenu a ibuprofenu. Stejně jako v kořenech slunečnice se i zde vyskytují dvě různé isoformy NADP-ME, přičemž isoforma nacházející se v horní části elektroforeogramu vykazuje výrazně vyšší aktivitu než isoforma ve spodní části.

V horní části obrázku 5.11 (b), který znázorňuje elektroforeogram pro pokusy s kořeny kukuřice, jsou vidět velmi slabé, avšak dobře ohraničené proužky, z nichž nejvyšší intenzitu má proužek v extraktu z kořene kukuřice pěstované v médiu s 10,11-epoxykarmazepinem a dále s acetaminofenem.

### 5.4.2 Detekce peroxidas rozpustné frakce v gelu

Následující dva elektroforeogramy ukazují detekci rozpustných peroxidas v extraktech z listů a kořenů slunečnice BELEM:



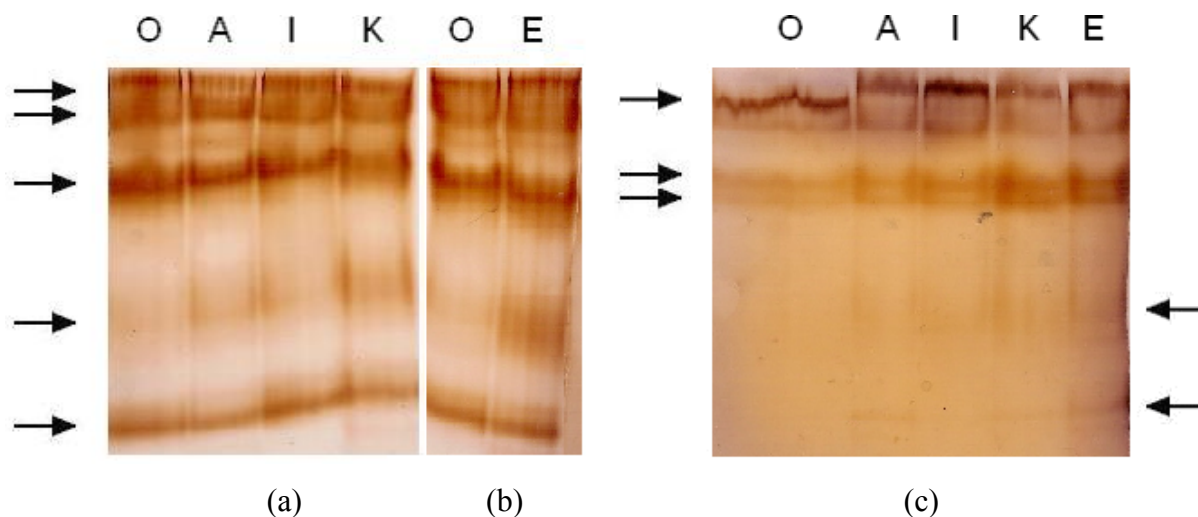
Obrázek 5.12: Detekce rozpustných peroxidas v gelu po elektroforetické separaci extraktů z listů (a) a kořenů (b) slunečnice BELEM. Označení extraktů: O – bez xenobiotika (kontrolní stanovení), A – acetaminofen, I – ibuprofen, K – karbamazepin, E – 10,11-epoxykarmazepin.

Na obrázku 5.12 (a) je elektroforeogram extraktů z listů slunečnice. V jeho horní části se vyskytují velice slabé proužky, o něco níže dvojice proužků těsně nad sebou, jejichž intenzita je též velice slabá (nejvyšší intenzita je pozorovatelná v extraktu z rostliny pěstované v přítomnosti acetaminofenu). V dolní části elektroforeogramu se nachází dvojice proužků o nejvyšší intenzitě, které jsou také těsně nad sebou. Tato dvojice proužků má nejvyšší intenzitu v extraktu z listů slunečnice pěstované v médiu s karbamazepinem a 10,11-epoxykarmazepinem.

Též v kořenech slunečnice se vyskytuje mnoho isoform cytosolárních peroxidas, jak je patrné z obrázku 5.12 (b). Na rozdíl od listů jsou však v extraktech z kořenů slunečnice hned dvě dvojice proužků o velice silné intenzitě, nacházející se ve spodní části elektroforeogramu. Intenzita těchto dvojic je nejvyšší v extraktech z kořenů slunečnice pěstované v médiu s karbamazepinem, avšak tento rozdíl je oproti ostatním stanovením malý.

Kromě toho jsou zde přítomny velice slabé proužky ve střední a horní části elektroforeogramu, které jsou nejsilnější v extraktech z kořenů slunečnice pěstované v přítomnosti karbamazepinu, rozdíl oproti ostatním stanovením je však opět malý.

Následující dva elektroforeogramy ukazují detekci rozpustných peroxidas v extraktech z listů a kořenů kukuřice G1:



Obrázek 5.13: Detekce rozpustných peroxidas v gelu po elektroforetické separaci extraktů z listů (a) a kořenů (b) kukuřice G1. Označení extraktů: O – bez xenobiotika (kontrolní stanovení), A – acetaminofen, I – ibuprofen, K – karbamazepin, E – 10,11-epoxykarbamazepin.

Na obrázku 5.13 (a) je elektroforeogram extraktů z listů kukuřice pěstované v přítomnosti acetaminofenu, ibuprofenu a karbamazepinu a extraktu z listů kukuřice pro kontrolní stanovení. Obrázek 5.13 (b) znázorňuje elektroforeogram extraktu z listů kukuřice pěstované v médiu s 10,11-epoxykarbamazepinem a extraktu z listů kukuřice pro kontrolní stanovení. Na obou obrázcích jsou patrné silné a výrazné proužky především v jejich horní části, a dále u jejich spodního okraje. Všechny tyto proužky mají přibližně stejnou intenzitu. Zhruba uprostřed elektroforeogramu se nachází proužek, který nemá ostré hranice. Jeho intenzita je nejvyšší v extraktu z listů kukuřice pěstované v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu.

Elektroforeogram na obrázku 5.13 (c) ukazuje extrakty z kořenů kukuřice. Jsou na něm patrné především proužky v horní části gelu, které jsou opět nejsilnější v extraktech z kořenů kukuřice pěstované v médiu s karbamazepinem a 10,11-epoxykarbamazepinem.

Stejně jako ve slunečnici se i v kukuřici vyskytuje více isoformů cytosolárních peroxidas. Zatímco v extraktech ze slunečnice se nejintenzivnější proužky vyskytují ve spodní části elektroforeogramu, v případě kukuřice se intenzivní proužky vyskytují v horní části, což dokládá rozdílnou expresi různých isoformů peroxidas u obou zmíněných rostlin.

## 6 DISKUSE

Fytoremediace představuje ekologický, vysoce efektivní a finančně nenákladný způsob odstraňování různých v přírodě špatně rozložitelných xenobiotik včetně léčiv z odpadních vod a životního prostředí. Mezi rostliny, které jsou testovány ohledně možného využití pro fytoremediační účely, patří i kukuřice (*Zea mays* L.) a slunečnice (*Helianthus annuus* L.) Kukuřice, která náleží mezi C<sub>4</sub> rostliny, vykazuje vysokou schopnost odebírání těžkých kovů (Zn, Cd, Cu, Pb) z půd a jejich akumulace v nadzemních částech rostliny [96]. Co se organických polutantů týče, kukuřice poměrně efektivně ukládala do svých pletiv a dále metabolizovala chlorované deriváty fenolu [97], pyren [98], dále například kyselinu trichloroctovou [99] nebo syntetický herbicid atrazin (2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazin) [100].

Slunečnice, patřící mezi C<sub>3</sub> rostliny, byla testována především v souvislosti s odebíráním uranu z půd, čemuž výrazně napomáhala přítomnost organických kyselin (např. kyseliny citronové) v půdách, které zvyšovaly jeho biologickou dostupnost [101]. Kromě toho vykazovala slunečnice dobrou schopnost akumulace těžkých kovů (Cd, Cr, Ni) [102]. V hydroponických podmínkách slunečnice efektivně odebírala z média benzotriazoly [39], dále účinně odebírala a degradovala fenantren [103] a použitý motorový olej [104].

Antikonvulzní léčivo karbamazepin je vlivem své vysoké stability špatně rozložitelné v přírodě, čímž dochází k jeho hromadění v životním prostředí [21]. V souvislosti s možným odstraněním karbamazepinu z různých složek hydrosféry byla sledována jeho oxidace prostřednictvím H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za spolupůsobení UV záření. Při tomto procesu docházelo ke vzniku kyslíkových radikálů, jejichž působení na karbamazepin vedlo k jeho degradaci za vzniku rozličných produktů, které nejčastěji obsahovaly hydroxylovou a karboxylovou skupinu. Jedním z prvních kroků v tomto degradačním procesu byla epoxidace karbamazepinu na 10,11-epoxykarbamazepin [94]. Tato látka je též metabolitem, který vzniká během první fáze biotransformace karbamazepinu v lidském těle. Následným otevřením epoxidového kruhu 10,11-epoxykarbamazepinu vzniká další metabolit karbamazepinu, *trans*-10,11-dihydroxykarbamazepin [28].

Byla provedena řada pokusů o syntézu 10,11-epoxykarbamazepinu z karbamazepinu, a to například působením kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové ve vodě po dobu 2 hodin za laboratorní teploty [105], kyseliny peroxyoctové, uhličitanu sodného a manganistanu draselného v dichlormethanu a kyselině octové při zahřívání k refluxu po dobu 1 hodiny [106]

nebo prostřednictvím oxonu a hydrogenuhličitanu sodného ve směsi acetonitril/voda po dobu 11 hodin za laboratorní teploty a následným působením siřičitanu sodného ve vodě po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty [107]. V rámci experimentů mé diplomové práce se mi podařilo připravit 10,11-epoxykarbamazepin epoxidací karbamazepinu prostřednictvím *m*-chlorperoxybenzoové kyseliny, jako rozpouštědlo byl však namísto vody použit chloroform. Syntéza této látky se za použití oxonu ani kyseliny peroxyoctové nezdařila.

Produktem štěpení epoxidového kruhu 10,11-epoxykarbamazepinu je vicinální diol *trans*-10,11-dihydroxykarbamazepin [28]. Otvírání epoxidů lze díky značnému pnutí tříčlenného kruhu provádět již za mírných podmínek jak kysele za použití anorganických i organických kyselin, tak i bazicky – například prostřednictvím hydroxidů [93,95]. Štěpení 10,11-epoxykarbamazepinu za vzniku 10,11-dihydroxykarbamazepinu bylo prováděno několika různými způsoby: prostřednictvím kyseliny chlorovodíkové ve vodě po dobu 6 hodin při 40 °C, prostřednictvím kyseliny trifluoroctové ve vodě po dobu 1 hodiny při 50 °C, pomocí směsi 10% vodného roztoku hydroxidu sodného a 100% ethanolu v poměru 2:1 po dobu 6 hodin při 40 °C, ve vodném prostředí po dobu 5 hodin při 90 °C. Ani jedním z uvedených způsobů se však epoxidový kruh 10,11-epoxykarbamazepinu otevřít nepodařilo. Vlivem přítomnosti dibenzazepinové struktury [27] je epoxidový kruh 10,11-epoxykarbamazepinu zřejmě natolik stabilní, že se za mírných podmínek pouhým působením kyselin či bazí neštěpí. V případě použití kyseliny chlorovodíkové, kyseliny trifluoroctové a hydroxidu sodného by tedy bylo v budoucnu vhodné provádět tuto reakci za vyšších teplot, případně modifikací rozpouštědla.

V souvislosti s použitými léčivy jako polutanty životního prostředí zatím nebylo provedeno mnoho fytoimediačních experimentů. Na katedře organické a jaderné chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v laboratoři Doc. Smrčka byly kultivovány rostliny v přítomnosti různých léčiv, mezi nimiž byl i ibuprofen a acetaminofen. Laskavec (*Amaranthus sp.*) odrůdy AMARANTUS přijímal ibuprofen velmi ochotně, po 72 hodinách od počátku experimentu byla v médiu přítomna pouze 2 % z původního množství léčiva. V médiu ječmenu jarního (*Hordeum vulgare* L.) odrůdy BOB nebyl ibuprofen po 96 hodinách od počátku experimentu prakticky detekovatelný [44]. Koncentrace acetaminofenu v médiu slunečnice odrůdy EXTRASOL lineárně klesala, avšak po 96 hodinách od počátku experimentu zbylo v médiu přibližně 40 % původního množství tohoto léčiva [108].

Při experimentech se slunečnicí BELEM a kukuřicí G1 prováděných v hydroponických podmínkách, které jsou popisovány v této práci, byla prokázána dobrá schopnost obou rostlin odebírat z média polární léčivé látky. Jednalo se především o ibuprofen obsahující

karboxylovou funkční skupinu, která se podílí na jeho dobré extrakci. Toto léčivo již po 48 hodinách od počátku experimentu nebylo v médiu detekovatelné (obrázek 5.2 (a)). Také koncentrace acetaminofenu, který je amidem a zároveň obsahuje hydroxylovou skupinu vázanou na aromatické jádro sloučeniny, v médiu v průběhu celého experimentu lineárně klesala, přičemž kukuřice G1 toto léčivo z média odebírala o trochu rychleji než slunečnice BELEM (obrázek 5.2 (b)).

Karbamazepin jakožto poměrně nepolární látka obsahující ve své molekule dibenzazepinovou strukturu [27] byl oběma rostlinami ukládán do pletiv velmi neochotně (obrázek 5.2 (c)). Koncentrace tohoto léčiva v médiu slunečnice BELEM po 96 hodinách od počátku experimentu klesla zhruba o 30 %. U kukuřice G1 se koncentrace karbamazepinu během celého experimentu klesla jen o 10 %. Tato skutečnost je v souladu s poznatky ohledně výskytu karbamazepinu v odpadních vodách, které dokládají špatnou degradovatelnost tohoto léčiva v přírodě, a tím i jeho akumulaci v životním prostředí [1,21,32].

10,11-epoxykarbamazepin vykazuje vlivem přítomnosti epoxidového kruhu oproti své mateřské molekule karbamazepinu vyšší polaritu, díky čemuž byl efektivně odebíráán z média kukuřicí G1 (obrázek 5.2 (d)). Koncentrace tohoto metabolitu v médiu kukuřice lineárně klesala, a to dokonce rychleji než u rostlin pěstovaných v přítomnosti acetaminofenu. Slunečnice BELEM naproti tomu 10,11-epoxykarbamazepin z média neodebírala téměř vůbec. Rozdíl v odebíráání tohoto metabolitu z média je zajímavý z hlediska odlišného mechanismu příjmu cizorodých látek, popř. přítomnosti odlišných rostlinných transportérů v kukuřici a slunečnici, které se tohoto procesu účastní. Bohužel však doposud není způsob extrakce xenobiotik rostlinami zcela objasněn, též nejsou známe možné transportéry, které se na odběru těchto látek podílejí [37].

Schopnost rostliny ukládat léčivo do svých pletiv byla v této práci vyjádřena množstvím léčiva v mg, které bylo rostlinou uloženo během 96 hodin, vztažené na 1 g hmotnosti této rostliny (obrázek 5.4). U kukuřice G1 i slunečnice BELEM se tato hodnota pohybovala kolem 1 mg/g pro ibuprofen a 0,8 mg/g pro acetaminofen. Pro karbamazepin byla tato hodnota přibližně 0,4 mg/g u slunečnice a 0,2 mg/g u kukuřice, což dokládá neochotu odebíráání tohoto léčiva z média. Zatímco kukuřice ukládá do svých pletiv 10,11-epoxykarbamazepin velmi efektivně – 1,2 mg/g – tedy dokonce ještě lépe než ibuprofen, slunečnice tento metabolit ukládá velmi málo, pouze 0,2 mg/g.

Přítomnost xenobiotik v médiu slunečnice BELEM a kukuřice G1 neměla na jejich hmotnost výrazný vliv (obrázek 5.3). Růst kukuřice byl všemi testovanými xenobiotiky stimulován, v případě ibuprofenu došlo dokonce k 30% nárůstu hmotnosti kukuřice oproti



kontrolním rostlinám. Hmotnost slunečnice nebyla vlivem přítomnosti karbamazepinu a 10,11-epoxykarmazepinu nijak výrazně ovlivněna. Zatímco vlivem přítomnosti ibuprofenu v médiu došlo k téměř 30% nárůstu hmotnosti slunečnice oproti kontrolnímu stanovení, přítomnost acetaminofenu v médiu vedla k 20% poklesu hmotnosti této rostliny.

V této práci byla v rostlinách kukuřice G1 a slunečnice BELEM pěstovaných v přítomnosti zmíněných xenobiotik sledována aktivita PEPC, NADP-ME a PPK. Jedná se o enzymy, které v  $C_4$  rostlinách katalyzují přídatné metabolické dráhy umožňující zvýšení koncentrace  $CO_2$  v chloroplastech buněk pochev cévních svazků, v nichž probíhá Calvinův cyklus [62,63]. V posledních letech bylo zjištěno, že tyto enzymy hrají důležitou roli i v  $C_3$  rostlinách, a to především za stresových podmínek [61].

Je zřejmé, že PEPC, NADP-ME a PPK plní v listech kukuřice jinou funkci než v kořenech kukuřice a listech i kořenech slunečnice. Právě v kořenech kukuřice došlo vlivem přítomnosti xenobiotik v kultivačním médiu k významnému zvýšení aktivity NADP-ME a PEPC v porovnání s kontrolními rostlinami (obrázek 5.5 a 5.6). Z toho vyplývá, že byl metabolismus buněk kořene ovlivněn jejich přítomností. V tomto případě hraje pravděpodobně roli anaplerotická funkce PEPC – doplňování intermediátů citrátového cyklu a jejich využití pro další syntetické pochody. Také významně zvýšená aktivita NADP-ME v kořenech kukuřice souvisí s vyšší produkcí redukčních ekvivalentů nutných pro různé biosyntetické procesy. Tyto enzymy byly v listech kukuřice ovlivněny mnohem méně, neboť aktivita NADP-ME byla vlivem přítomnosti xenobiotik v médiu zvýšena oproti kontrolním stanovením jen mírně. Tato skutečnost může souviset s přítomností fotosyntetických isoform, které nejsou léčivý příliš ovlivněny a které se zde vyskytují ve vyšší aktivitě než nefotosyntetické isoformy NADP-ME. Opačné výsledky byly zjištěny pro PEPC z listů kukuřice, v nichž byla aktivita tohoto enzymu v porovnání s kontrolními rostlinami nižší. Z toho vyplývá, že přítomnost použitých xenobiotik může negativně ovlivnit fotosyntézu kukuřice.

Zástupcem  $C_3$  rostlin byla v této studii slunečnice BELEM. Zvýšení aktivity NADP-ME bylo patrné spíše v nadzemních částech než v kořenech, zatímco zvýšení aktivity PEPC bylo zjištěno pouze v listech slunečnice pěstované v přítomnosti ibuprofenu a 10,11-epoxykarmazepinu (obrázek 5.5 a 5.6).

Peroxidasy se obecně v rostlinách vyskytují ve vysokých aktivitách a ve formě mnoha isoenzymů. V této práci byla měřena aktivita rozpustných i vázaných isoform peroxidas za použití 3,3'-diaminobenzidinu jako substrátu. Též bylo sledováno zastoupení jednotlivých isoform peroxidas v rozpustné frakci pomocí elektroforézy v nedenaturujícím prostředí

(obrázek 5.12 a 5.13). Zvýšená aktivita peroxidás v rostlinách pěstovaných v přítomnosti použitých xenobiotik byla pro vázané isoformy nalezena zvláště v rostlinách slunečnice (jak v listech, tak i v kořenech, obrázek 5.9), méně pak v rostlinách kukuřice (především v listech rostlin pěstovaných v přítomnosti karbamazepinu, obrázek 5.9). Podle očekávání je v kořenech a listech obou rostlin přítomno mnoho isoform peroxidás, které jsou navíc v obou rostlinách zastoupeny v odlišné míře (obrázek 5.12 a 5.13).

Ne vždy se spektrofotometrické stanovení aktivity NADP-ME a peroxidás rozpustné frakce shodovalo s výsledky nativní elektroforézy. Největší rozpor byl pozorován v případě extraktu z listů kukuřice pěstované v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu. Zatímco na základě spektrofotometrického stanovení došlo k poklesu aktivity tohoto enzymu oproti kontrole o téměř 60 % (obrázek 5.5 (a)), proužek extraktu z listů stejné rostliny byl na elektroforeogramu nejsilnější spolu s proužkem extraktu z listů kukuřice pěstované v médiu s karbamazepinem (obrázek 5.11 (a)). V tomto případě lze za věrohodnější považovat výsledek detekce NADP-ME v gelu prostřednictvím nativní elektroforézy.

Na základě výše uvedených poznatků lze konstatovat, že jak slunečnice BELEM, tak kukuřice G1 jsou vhodnými rostlinnými druhy pro fytořemediaci odpadních vod znečištěných ibuprofenem, acetaminofenem, neboť jsou tato xenobiotika rostlinami dobře odebírána z média a jejich růst a metabolismus není v přítomnosti těchto látek nijak dramaticky ovlivněn. Pro fytořemediaci složek hydrosféry znečištěných 10,11-epoxykarbamazepinem je vhodnější použití kukuřice G1, která jej do svých pletiv ukládá mnohem snáze než slunečnice. Žádnou z testovaných rostlin však nelze aplikovat při fytořemediaci vod obsahujících karbamazepin, neboť je toto léčivo odebíráno těmito rostlinami velice neochotně.

Je zřejmé, že způsob a míra ovlivnění metabolismu rostlin použitými xenobiotiky velmi závisí na konkrétním rostlinném druhu a způsobu, jakým tato rostlina fixuje CO<sub>2</sub>. Při testování konkrétní rostliny jako možného druhu pro fytořemediační odstranění léčiv v odpadních vodách je proto zapotřebí provést podrobnější analýzy.

## 7 SOUHRN

1. Pro fytoimediační pokusy byla úspěšně provedena syntéza 10,11-epoxykarbamazepinu epoxidací dvojné vazby karbamazepinu prostřednictvím kyseliny *m*-chlorperoxybenzoové, výtěžek reakce činil 56 %. Otevření epoxidového kruhu 10,11-epoxykarbamazepinu za vzniku 10,11-dihydroxykarbamazepinu se žádným z uvedených postupů provést nezdařilo.
2. Byl sledován příjem léčiv ibuprofenu, acetaminofenu, karbamazepinu a jeho metabolitu 10,11-epoxykarbamazepinu rostlinami slunečnice BELEM a kukuřice G1. Hmotnost rostlin pěstovaných v přítomnosti xenobiotik vykazovala převážně mírný nárůst oproti kontrolnímu stanovení, a to především u kukuřice. Z média byl oběma rostlinami nejlépe odebírán ibuprofen a dále acetaminofen. Zatímco kukuřice odebírala 10,11-epoxykarbamazepin z média snadno, slunečnice nikoli. Karbamazepin obě rostliny ukládaly do svých pletiv velmi neochotně.
3. V experimentálních rostlinách byla měřena aktivita enzymů NADP-ME, PEPC a PPKK. V kořenech kukuřice byl ve srovnání s listy pozorován velmi výrazný nárůst aktivity NADP-ME a PEPC oproti kontrole. Nejvýraznější nárůst aktivity všech tří enzymů byl pozorován převážně v rostlinách pěstovaných v přítomnosti 10,11-epoxykarbamazepinu.
4. V experimentálních rostlinách byla měřena aktivita rozpustných a vázaných peroxidas, též bylo sledováno jejich isoenzymové složení. Aktivita vázaných isoform peroxidas byla oproti kontrole zvýšena především v rostlinách slunečnice a to jak v listech, tak i v kořenech.

## 8 LITERATURA

1. Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., Ternes, T. A.: Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental Science & Technology* 39, 5209-5218 (2005).
2. Larsson, D. G. J., de Pedro, C., Paxeus, N.: Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials* 148, 751-755 (2007).
3. Randak, T., Li, Z. H.: Residual pharmaceutically active compounds (PhACs) in aquatic environment – status, toxicity and kinetics: a review. *Veterinarni Medicina* 52, 295-314 (2009).
4. Nikolau, A., Meric, N., Fatta, D.: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1225-1234 (2007).
5. Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T.: Léčiva – „nový“ environmentální polutant. *Chemické listy* 103, 540-547 (2009).
6. Lange, R., Dietrich, D.: Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances – conceptual considerations. *Toxicology Letters* 131, 97-104 (2002).
7. Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N.: Human Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes. *Critical Reviews in Environmental Science & Technology* 35, 401-427 (2005).
8. Parkinson, A.: Chapter 6: Biotransformation of xenobiotics, 133-137, The McGraw-Hill Companies (2001). Staženo z webu [http://www.earthwebz.com/library/holistichealth/Herbs%20and%20Homeopathy/Books%20on%20Poisons%20and%20their%20Antidotes/Casarett%20and%20Doulls%20Toxicology%20-%20The%20Basic%20Science%20of%20Poisons%20-%206thEd/S2\\_Ch06\\_BiotransformationOfXenobiotics.pdf](http://www.earthwebz.com/library/holistichealth/Herbs%20and%20Homeopathy/Books%20on%20Poisons%20and%20their%20Antidotes/Casarett%20and%20Doulls%20Toxicology%20-%20The%20Basic%20Science%20of%20Poisons%20-%206thEd/S2_Ch06_BiotransformationOfXenobiotics.pdf) (15. 3. 2012).

9. Dong, H., Haining, R. L., Thummel, K. E., Rettie, A. E., Nelson, S. D.: Involvement of Human Cytochrome P450 2D6 in the Bioactivation of Acetaminophen. *Drug Metabolism and Disposition* 28, 1397-1400 (2000).
10. Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D.: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122-159 (2006).
11. Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T.: Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36, 1202-1211 (2002).
12. Al-Talla, Z. A., Akrawi, S. H., Tolley, L. T., Sioud, S. H., Zaater, M. F., Emwas, A.-H. M.: Bioequivalence assessment of two formulations of ibuprofen. *Drug Design, Development and Therapy* 5, 427-433 (2011).
13. Buser, H.-R., Poiger, T., Müller, M. D.: Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology* 33, 2529-2535 (1999).
14. White, M. C., Howat, J.: The Therapeutic Potential of Phospholipase A2 Inhibitors in Cardiovascular Disease. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 5, 91-95 (2007).
15. Hurt-Camejo, E., Camejo, G., Peilot, H., Öörni, K., Kovanen, P.: Phospholipase A2 in vascular disease. *Circulation Research* 89, 298-304 (2001).
16. Kramer, R. M., Sharp, J. D.: Structure, function and regulation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Letters* 410, 49-53 (1997).
17. Nelson, D. L., Cox, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition, Chapter 21: Lipid Biosynthesis, 802-803. W. H. Freeman, University of Wisconsin - Madison, USA (2004). ISBN: 0716743396, 978-0716743392.

18. Martínez, C., García-Martín, E., Blanco, G., Gamito, F. J. G., Ladero, J. M., Agúndez, J. A. G.: The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology* 59, 62-68 (2004).
19. Durrmeyer, X., Hovhannisyán, S., Médard, Y., Jacqz-Aigrain, E., Decobert, F., Barre, J., Alberti, C., Aujard, Y., Danan, C., Baud, O.: Are Cytochrome P450 CYP2C8 and CYP2C9 Polymorphisms Associated with Ibuprofen Response in Very Preterm Infants? *PLoS ONE* 5: e12329 (2010).
20. Heberer, T.: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131, 5-17 (2005).
21. Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M. C. B. S. M.: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175, 45-95 (2010).
22. Davies, R. A., Maher, C. G., Hancock, M. H.: A systematic review of paracetamol for non-specific low back pain. *European Spine Journal* 17, 1423-1430 (2008).
23. Kalantzi, L., reppas, C., Dressman, J. B., Amidon, G. L., Junginger, H. E., Midha, K. K., Shah, V. P., Stavchansky, S. A., Barends, D. M.: Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Acetaminophen (paracetamol). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95, 4-14 (2006).
24. Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L.: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13926-13931 (2002).
25. Hinz, B., Cheremina, O., Brune, K.: Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 383-390 (2008).

26. Shen, C., Zhang, G., Qiu, H., Meng, Q.: Acetaminophen-induced hepatotoxicity of gel entrapped rat hepatocytes in hollow fibers. *Chemico-Biological Interactions* 162, 53-61 (2006).
27. Zeitler, J. A., Newnham, D. A., Taday, P. F., Strachan, C. J., Pepper, M., Gordon, K. C., Rades, T.: Temperature dependent terahertz pulsed spectroscopy of carbamazepine. *Thermochimica Acta* 436, 71-77 (2005).
28. Kim, E.: Uses of Carbamazepine for Psychiatric Disorders: A Review. *Jefferson Journal of Psychiatry* 6, 63-72 (1988).
29. Nurmikko, T. J., Eldridge, P. R.: Trigeminal neuralgia-patophysiology, diagnosis and current treatment. *British Journal of Anaesthesia* 87, 117-132 (2001).
30. Owen, A., Pirmohamed, M., Tettey, J. N., Morgan, P., Chadwick, D., Park, B. K.: Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *British Journal of Clinical Pharmacology* 51, 345-349 (2001).
31. Ambrósio, A. F., Soares-da-Silva, P., Carvalho, C. M., Carvalho, A. P.: Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbamazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochemical Research* 27, 121-130 (2002).
32. Jos, A., Repetto, G., Rios, J. C., Hazen, M. J., Molero, M. L., del Peso, A., Salguero, M., Fernández-Freire, P., Pérez-Martín, J. M., Cameán, A.: Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in Vitro* 17, 525-532 (2003).
33. Tate, S. K., Depondt, C., Sisodiya, S. M., Cavalleri, G. L., Schorge, S., Soranzo, N., Thom, M., Sen, A., Shorvon, S. D., Sander, J. W., Wood, N. W., Goldstein, D. B.: Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 5507-5512 (2005).

34. Lüllman, H., Mohr, K., Wehling, M.: Farmakologie a toxikologie – překlad 15. zcela přepracovaného vydání, 382-383. Grada Publishing a.s., Praha, ČR (2004). ISBN: 8024708361, 9788024708362.
35. Stahl, S. M.: Anticonvulsants as Mood Stabilizers and Adjuncts to Antipsychotics: Valproate, Lamotrigine, Carbamazepine, and Oxcarbamazepine nad Actions at Voltage-Gated Sodium Channels. *Journal of Clinical Psychiatry* 65, 738-739 (2004).
36. Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N.: Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research* 38, 947-954 (2004).
37. Meagher, R. B.: Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 153-162 (2000).
38. Marmiroli, N., Marmiroli, M., Maestri, E.: Phytoremediation and phytotechnologies: a review for the present and the future. *Earth and Environmental Sciences* 69, 403-416 (2006).
39. Newman, L. A., Reynolds, C. M.: Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 225-230 (2004).
40. Terry, N, Bañuelos, G. S.: Phytoremediation of contaminated soil and water, First Edition, Chapter 1: Field Demonstrations of Phytoremediation of Lead-Contaminated Soils, 1-4. Lewis Publishers, University of California, Berkeley, USA (2000). ISBN: 1566704502, 9781566704502.
41. Macek, T., Macková, M., Káš, J.: Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18, 23-34 (2000).
42. Molinari, R., Gallo, S., Arguiro, P.: Metal ions removal from wastewater or washing water from contaminated soil by ultrafiltration-complexation. *Water research* 38, 593-600 (2004).



43. Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S. C.: Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18, 647-658 (2002).
44. Smrček, S., Pšondrová, Š.: Osobní sdělení (27.7.2012).
45. Trapp, S., Karlson, U.: Aspects of Phytoremediation of Organic Pollutants. *Journal of Soils and Sediments* 1, 37-43 (2001).
46. Briggs, G. G., Bromilow, R. H., Evans, A. A.: Relationships Between Lipophilicity and Root Uptake and Translocation of Non-ionised Chemicals by Barley. *Pesticide Science* 13, 495-504 (1982).
47. Braizer-Hicks, M., Offen, W. A., Gershater, M. C., Revett, T. J., Lim, E.-K., Bowles, D. J., Davies, G. J., Edwards, R.: Charakterisation and engineering of the bifunctional *N*- and *O*-glukosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20238-20343 (2007).
48. Sandermann, H.: Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 4, 225-241 (1994).
49. Stiborová, M.: Osobní sdělení (29.6.2012).
50. Anderson, C. W. N., Brooks, R. R., Chiarucci, A., LaCoste, C. J., Leblanc, M., Robinson, B. H., Simcock, R., Stewart, R. B.: Phytomining of nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* 67, 407-415 (1999).
51. Rugh, C. L., Wilde, H. D., Stack, N. M., Thompson, D. M., Summers, A. O., Meagher, R. B.: Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsos thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 3182-3187 (1996).
52. Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., Bayona, J. M.: Removal of Pharmaceutials and Personal Care Products (PPCPs) from Urban Wastewater in a Pilot Vertical Flow

- Constructed Wetland and a Sand Filter. *Environmental Science & Technology* 41, 8171-8177 (2007).
53. Zhang, B. Y., Zheng, J. S., Sharp, R. G.: Phytoremediation in Engineered Wetlands: Mechanisms and Applications. *Procedia Environmental Sciences* 2, 1315-1325 (2010).
  54. Imfeld, G., Braeckevelt, M., Kusch, P., Richnow, H. H.: Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74, 349-362 (2009).
  55. Grismer, M. E., Shepherd, H. L.: Plants in constructed wetlands help to treat agricultural processing wastewater. *California Agriculture* 65, 73-79 (2011).
  56. Brix, H.: Use of constructed wetlands in water pollution control: Historical development, present status, and future perspectives. *Water and Science Technology* 30, 209-223 (1994).
  57. Mietto, A.: Phytoremediation efficiency: Assessment of removal processes and hydraulic performance in constructed wetlands, Chapter 1: Introduction, 11-12. *Disertační práce*, Università Ca' Foscari di Venezia, Itálie (2009).
  58. Stottmeister, U., Weissner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., Müller, R. A., Moormann, H.: Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22, 93-117 (2003).
  59. Hijosa-Valsero, M., Matamoros, V., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J., Bécares, E., Bayona, J. M.: Comprehensive assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. *Water Research* 44, 3669-3678 (2010).
  60. Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Leile, D., Mench, M.: Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794 (2009).

61. Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: What can enzymes of C<sub>4</sub> photosynthesis do for C<sub>3</sub> plants under stress? *Plant Science* 180, 575-583 (2011).
62. Ku, M. S. B., Kano-Murakami, Y., Matsuoka, M.: Evolution and Expression of C<sub>4</sub> Photosynthesis Genes. *Plant Physiology* 111, 949-957 (1996).
63. Furbank, R. T., Taylor, W. C.: Regulation of Photosynthesis in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants: A Molecular Approach. *The Plant Cell* 7, 797-807 (1995).
64. Johnson, J. F., Vance, C. P., Allan, D. L.: Phosphorus Deficiency in *Lupus albus*. *Plant Physiology* 112, 31-41 (1996).
65. Buchanan, B. B., Wolosiuk, R. A.: Modulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C<sub>4</sub> and CAM plants (2002). Staženo z <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=&id=123> (20. 3. 2012).
66. Sánchez, R., cejudo, F. J.: Identification and Expression Analysis of a Gene Encoding a Bacterial-Type Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology*, 132, 949-957 (2003).
67. Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M. H.: Phosphoenolpyruvate Carboxylase: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 273-298 (1996).
68. Müller, K., Doubnerová, V., Synková, H., Čeřovská, N., Ryšlavá, H.: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in PVY<sup>NTN</sup>-infected tobacco plants. *Biological Chemistry* 390, 245-251 (2009).
69. Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čeřovská, N.: Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* 41, 357-363 (2003).
70. Rothermel, B. A., Nelson, T.: Primary Structure of the Maize NADP-dependent Malic Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 19587-19592 (1989).

71. Wheeler, M. C., Tronconi, M. A., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Flugge, U. I., Maurino, V. G.: A Comprehensive Analysis of the NADP-Malic Enzyme Gene Family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 39-51 (2005).
72. Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S.: NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* 490, 1-6 (2001).
73. Edwards, G. E., Andreo, C. S.: NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry* 31, 1845-1857 (1992).
74. Doubnerová, V., Müller, K., Čeřovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: Effect of potato virus Y on the NADP-malic enzyme from *Nicotiana tabacum* L.: mRNA expressed protein and activity. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3583-3598 (2009).
75. Burnell, J. N., Chastain, C. J.: Cloning and expression of maize-leaf pyruvate, Pi dikinase regulatory protein gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345, 675-680 (2006).
76. Chastain, C. J., Fries, J. P., Vogel, J. A., Randklev, C. L., Vossen, A. P., Dittmer, S. K., Watkins, E. E., Fiedler, L. J., Wacker, S. A., Meinhover, K. C., Sarath, G., Chollet, R.: Pyruvate, Orthophosphate Dikinase in Leaves and Chloroplasts of C<sub>3</sub> Plants Undergoes Light-/Dark-Induced Reversible Phosphorylation. *Plant Physiology* 128, 1368-1378 (2002).
77. Chastain, C. J., Xu, W., Parsley, K., Sarath, G., Hibberd, J. M., Chollet, R.: The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins of *Arabidopsis* possess a novel, unprecedented Ser/Thr protein kinase primary structure. *The Plant Journal* 53, 854-863 (2008).
78. Chastain, C. J., Heck, J. W., Colquhoun, T. A., Voge, D. G., Gu, X. Y.: Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (*Oryza sativa*) seeds. *Planta* 224, 924-934 (2006).

79. Taylor, L., Nunes-Nesi, A., Parsley, K., Leiss, A., Leach, G., Coates, S., Wingler, A., Fernie, A. R., Hibberd, J. M.: Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *The Plant Journal* 62, 641-652 (2010).
80. Ohta, S., Ishida, Y., Usami, S.: Expression of cold-tolerant pyruvate, orthophosphate dikinase cDNA, and heterotetramer formation in transgenic maize plants. *Transgenic Research* 13, 475-485 (2004).
81. Wang, D., Portis Jr., A. R., Moose, S. P., Long, S. P.: Cool C<sub>4</sub> photosynthesis: pyruvate P<sub>i</sub> dikinase expression and activity corresponds to the exceptional cold tolerance of carbon assimilation in *Miscanthus x giganteus*. *Plant Physiology* 148, 557-567 (2008).
82. Casati, P., Zhang, X., Burlingame, A. L., Walbot, V.: Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 1673-1685 (2005).
83. Huang, S., Greenway, H., Colmer, T. D., Millar, A. H.: Protein synthesis by rice coleoptiles during prolonged anoxia: implications for glycolysis growth and energy utilization. *Annals of Botany* 96, 703-715 (2005).
84. Moons, A., Valcke, R., Van Montagu, M.: Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C<sub>3</sub> plant. *The Plant Journal* 15, 89-98 (1998).
85. Doubnerová, V., Janoušková, M., Synková, H., Šubr, Z., Čerovská, N., Ryšlavá, H.: Effect of Potato virus Y on activities of antioxidant and anaerobic enzymes in *Nicotiana tabacum* L. transgenic plants with the gene for P<sub>3</sub> protein. *General and Applied Plant Physiology* 33, 123-140 (2007).
86. Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R. N. F.: Purification and Characterisation of a Novel Class III Peroxidase Isoenzyme from Tea Leaves. *Plant Physiology* 114, 1237-1245 (1997).

87. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chemické Listy* 95, 212-222 (2001).
88. Poulos, T. L., Kraut, J.: The Stereochemistry of Peroxidase Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 8199-8205 (1980).
89. Veitch, N. C.: Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry reviews* 3, 3-18 (2004).
90. Svoboda, J.: *Organická syntéza I, první vydání, kapitola 3: Oxidace, 76-77. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, ČR (2000). ISBN: 80-7080-385-1.*
91. Zolfigol, M. A., Niknam, K., Bagherzadeh, M., Ghorbani-Choghamarani, A., Koukabi, N., Hajjami, M., Kolvari, E.: Tribromoisocyanuric Acid (TBICA) and Oxone®-MX Systems as Oxidizing Agents: Oxidative Coupling of Thiols to their Corresponding Disulfides under Mild and Heterogeneous Conditions. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54, 1115-1118 (2007).
92. Travis, B. R., Sivakumar, M., Hollist, G. O., Borhan, B.: Facile Oxidation of Aldehydes to Acids and Esters with Oxone. *Organic Letters* 5, 1031-1034 (2003).
93. McMurry, J.: *Organická Chemie, šestá edice, kapitola 18: Etery a epoxidy, thioly a sulfidy, 644-652. Vysoké učení technické v Brně / nakladatelství VUTIUM, Brno, ČR (2007). ISBN: 978-80-214-3291-8.*
94. Vogna, D., Marotta, R., Andreozzi, R., Napolitano, A., d'Ischia, M.: Kinetic and chemical assessment of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere* 54, 497-505 (2004).
95. March, J.: *Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms, and structure, Third Edition, Chapter 19: Oxidations and Reductions, 1520-1521. John Wiley Sons, USA (1985). ISBN: 0-471-85472-7.*

96. Wuana, R. A., Okieimen, F. E.: Phytoremediation Potential of Maize (*Zea mays* L.). A Review. African Journal of General Agriculture 6, 275-287 (2010).
97. Harvey, P., Campanella, B., Castro, P. M. L., Harms, H., Lichtfouse, E., Schäffner, A., Smrček, S., Werck-Reichhart, D.: Phytoremediation of Polyaromatic Hydrocarbons, Anilines and Phenols. Environmental Science and Pollution Research 1, 29-47 (2002).
98. Zhang, H., Dang, Z., Zheng, L. C., Yi, X. Y.: Remediation of soils co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.). International Journal of Environmental Science and Technology 6, 249-258 (2009).
99. Gao, Y., Zhu, L.: Phytoremediation and its models for organic contaminated soils. Journal of Environmental Sciences 15, 302-310 (2003).
100. Huang, H., Zhang, S., Chen, B. D., Wu, N., Shan, X. Q., Christy, P.: Uptake of Atrazine and Cadmium from Soil by Maize (*Zea mays* L.) in Association with the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus etunicatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 9377-9382 (2006).
101. Huang, J. W., Blaylock, M. J., Kapulnik, Y., Ensley, B. D.: Phytoremediation of Uranium-Contaminated Soils: Role of Organic Acids in Triggering Uranium Hyperaccumulation in Plants. Environmental Science & Technology 32, 2004-2008 (1998).
102. Turgut, C., Pepe, M. K., Cutright, T. J.: The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr and Ni from soil using *Helianthus annuus*. Environmental Pollution 131, 147-154 (2004).
103. Liste, H. H., Alexander, M.: Rapid Screening of Plants Promoting Phenanthrene Degradation. Journal of Environmental Quality 28, 1375-1377 (1999).
104. Dominguez-Rosado, E., Pichtel, J.: Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Greenhouse Studies. Environmental Engineering Science 21, 169-180 (2004).

105. MacLeod, T. C. O., Barros, V. P., Faria, A. L., Schiavon, M. A., Yoshida, I. V. P., Queiroz, M. E. C., Assis, M. D.: Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 273, 259-264 (2007).
106. Learmonth, D. A.: Process for the preparation of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide. UK Patent Application 2422149 (19.6.2006).
107. Hideki, T.: Preparation of dibenzo[b,f]azepinecarboxamide derivative. Japan, Kokai Tokkyo Koho 2004175761 (24.6.2004).
108. Bažilová, B.: Fytoextrakce nesteroidních analgetik. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, ČR (2012).



