

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**Biotransformace flubendazolu
a albendazolu v rostlinných buňkách**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Helena Seidlová

Prohlašuji tímto, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Souhlasím, aby moje práce byla volně k dispozici k nahlédnutí ke studijním účelům.

Ráda bych poděkovala Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D., RNDr. Radce Podlipné za umožnění práce v Laboratoři rostlinných biotechnologií Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR v Praze a laboratořích Katedry biochemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Děkuji za pomoc a vedení v řešení úkolů, postupů a vyhodnocování výsledků při vypracování mé diplomové práce. Děkuji také Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. a Mgr. Ivanu Vokřáloví za provedení HPLC a HPLC/MS analýzy.

Tato práce byla financována Grantovou agenturou České republiky, grant č. P502/10/0217 a Technologickou agenturou České republiky, grant č. TA01020573.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Helena Seidlová

Školitel: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Biotransformace flubendazolu a albendazolu v rostlinných buňkách

Benzimidazolová anthelmintika jsou léčiva proti parazitickým červům hojně používaná u lidí i zvířat. Vylučováním se mohou tyto látky dostávat a perzistovat v životním prostředí a ovlivňovat necílené organismy. Vhodnou metodou pro odstranění anthelmintik z prostředí by mohla být fyto-remediace. Abychom zjistili detoxifikační schopnosti rostlin, studovali jsme biotransformační cesty albendazolu (ABZ) a flubendazolu (FLU) u rákosu (*Phragmites australis*) *in vitro*. Bylo zjištěno, že buňky rákosu jsou schopné přijímat a metabolizovat obě tato anthelmintika. Tato léčiva nemají významnější vliv na viabilitu buněk rákosu. Pomocí HPLC/MS bylo nalezeno 10 metabolitů ABZ a 5 metabolitů FLU. Bylo identifikováno také několik atypických metabolitů (glukosylglukosidy, acetylglukosidy a xylosylglukosidy), které nebyly dosud popisovány. Na základě výsledků, bylo navrženo schéma metabolických cest ABZ a FLU u rákosu. Pomocí HPLC byl kvantifikován obsah hlavních metabolitů (redukovaného FLU, ABZ-sulfoxidu, ABZ-sulfonu) v buňkách rákosu i v kultivačním médiu. Většinu metabolitů ABZ a FLU můžeme považovat za látky s nižším anthelmintickým působením oproti patentním léčivům. Proto lze usuzovat, že rákos může být s výhodou použit k detoxikaci a odstranění těchto anthelmintik z pastvin a vodních zdrojů.

Bylo sledováno ovlivnění proteomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v přítomnosti FLU pomocí dvourozměrné elektroforézy. Na „stain-free“ gelech bylo patrné zvýšení množství 1 proteinu a snížení množství 3 proteinů vlivem FLU. Při barvení gelů pomocí Coomassie brilliant blue G 250 bylo nalezeno 5 proteinů, jejichž množství bylo ovlivněno FLU. Identifikace těchto proteinů bude předmětem další studie.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Helena Seidlová

Supervisor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Biotransformation of flubendazole and albendazole in plant cells

Benzimidazole anthelmintics, the drugs against parasitic worms, are widely used in human as well as in veterinary medicine. Following excretion, these substances may persist in the environment and impact non-target organisms. Phytoremediation might be a suitable method for elimination of anthelmintics from the environment. In order to test detoxification abilities of plants, biotransformation pathways of albendazole (ABZ) and flubendazole (FLU) were studied in reed (*Phragmites australis*) *in vitro*. It was found that reed cells were able to uptake and biotransform both anthelmintics. These drugs did not significantly affect viability of the reed cells. Using HPLC/MS 10 ABZ metabolites and 5 FLU metabolites were found. Some atypical biotransformation metabolites (glucosylglucosides, acetylglucosides and xylosylglucosides), which have not been previously reported were identified. Based on the obtained results, the schemes of metabolic pathways of ABZ and FLU in reed were proposed. The amount of main metabolites (reduced FLU, ABZ-sulfoxide, ABZ-sulfone) in reed cells and cultivation media were quantified using HPLC. The majority of ABZ and FLU metabolites can be considered as less effective anthelmintic agents compared to patented drugs. Thus, reed could be used for the removal and detoxification of these anthelmintics in pastures and water sources.

The effects of FLU on the proteome of *Arabidopsis thaliana* was evaluated using two-dimensional electrophoresis. The „stain free“ gels revealed an elevated amount of 1 protein and a reduced amount of 3 other proteins in the presence of FLU. Staining of the gels with Commassie Brilliant blue G 250 showed the presence of 5 proteins with altered quantities due to the presence of FLU. Identification of these proteins will be a focus of further study.

Obsah:

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Léčiva v životním prostředí.....	9
2.2. Ekotoxicita léčiv.....	13
2.3. Možnosti fytořemediace xenobiotik.....	16
2.3.1. Hlavní druhy a mechanismy fytořemediace.....	20
2.4. Použité rostliny.....	23
2.4.1. Rákos obecný (<i>Phragmites australis</i>).....	23
2.4.2. Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	25
2.5. Umělé mokřadní systémy a role rákosu.....	26
2.6. Anthelmintika.....	32
2.6.1. Benzimidazolová anthelmintika.....	33
2.6.1.1. Albendazol.....	34
2.6.1.2. Flubendazol.....	35
2.6.2. Rezistence u anthelmintik.....	36
3. Cíl práce.....	38
4. Experimentální část.....	39
4.1. Materiál, pomůcky, přístroje.....	39
4.1.1. Chemikálie.....	39
4.1.2. Pomůcky a přístroje.....	41
4.1.3. Biologický materiál.....	42
4.2. Metodika práce.....	43
4.2.1. Kultivace rostlin.....	43
4.2.1.1. Rákos.....	43
4.2.1.2. Huseníček.....	45
4.2.2. Biotransformační studie ABZ a FLU v rostlinných buňkách.....	47
4.2.3. Test viability rostlinných buněk.....	48

4.2.4. Příprava extraktů pro analýzu.....	48
4.2.4.1. Extrakce metabolitů z kultivačních médií.....	48
4.2.4.2. Extrakce lyofilizovaných buněk rákosu.....	49
4.2.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS).....	49
4.2.6. Kvantifikace obsahu hlavních metabolitů pomocí HPLC.	50
4.2.7. Dvourozměrná gelová elektroforéza.....	50
5. Výsledky.....	55
5.1. Vliv FLU na viabilitu buněk.....	55
5.2. Biotransformace FLU v buněčné suspenzi.....	56
5.2.1. Identifikace metabolitů FLU.....	56
5.2.2. Stanovení koncentrace hlavního metabolitu FLU.....	58
5.3. Biotransformace ABZ v buněčné suspenzi.....	59
5.3.1. Identifikace metabolitů ABZ	59
5.3.2. Stanovení koncentrace hlavních metabolitů ABZ	62
5.4. Vliv FLU na rostlinný proteom.....	64
6. Diskuze.....	66
7. Závěr.....	71
8. Použité zdroje.....	72

1. Úvod

Přítomnost humánních a veterinárních léčiv v životním prostředí se stává aktuálním problémem. Proto také stoupá zájem společnosti zkoumat vliv léčiv na prostředí a navrhnout účinná a ekonomicky možná řešení, šetrná k životnímu prostředí i člověku samému. O ekotoxikologických účincích mnoha léčiv je zatím velmi málo informací, proto by se mělo jednat o dynamickou oblast výzkumu. I když se do prostředí dostává velká řada léčiv, jen některá jsou považována za významná v oblasti znečištění životního prostředí a to hlavně z důvodů objemů jejich spotřeby, toxicity a perzistence. Jsou to hlavně: beta blokátory, cytostatika a nádorová terapeutika, analgetika, protizánětlivé léky, steroidní hormony, neuroaktivní sloučeniny, antiparazitika, léčiva snižující hladinu cholesterolu v krvi a antibiotika (Morley, 2009).

Jednou z možností, jak detoxikovat a odstranit léčiva z životního prostředí, je využít fytoemediaci tj. technologii využívající rostliny k degradaci nebo akumulaci kontaminantů. Rostliny mohou přeměňovat a rozkládat velmi široké rozpětí organických sloučenin. Rozšiřující se znalosti mechanismů účastnících se fytoemediace slibují velké možnosti v použití rostlin k široké škále environmentálního úsilí. Byl zaznamenán významný vývoj ve výzkumu přírodních i geneticky modifikovaných rostlin použitelných k remediaci škodlivin v životním prostředí (Meagher, 2000).

V této práci jsem se zabývala anthelmintiky, léčivy používanými při léčbě i prevenci nemocí způsobených parazitujícími červy. Právě benzimidazolová anthelmintika jsou velmi často a široce využívána ve veterinární praxi, což způsobuje významné znečištění pastvin a odpadních a podzemních vod. Zkoumala jsem proto potenciál rostlinných buněk přijímat a metabolizovat dvě významná benzimidazolová anthelmintika flubendazol (FLU) a albendazol (ABZ). Sledovala jsem také ovlivnění rostlinného proteomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) po expozici FLU.

2. Teoretická část

2.1. Léčiva v životním prostředí

Mezi nejvýznamnější přírodní kontaminanty patří perzistentní organické polutanty (dichlordifenyltrichloroethan, polychlorované bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky, organické pesticidy), polybromované retardátory hoření, přípravky pro osobní hygienu a **farmaka**. Farmaka lze rozdělit podle jejich odolnosti vůči životnímu prostředí na lehce odbouratelná (např. kyselina acetylsalicylová), na látky stálé a hydrofilní (např. bezafibrát), látky stálé a lipofilní (např. ofloxacin). Nejnebezpečnější jsou látky lipofilní. Léčiva v odpadních vodách lze díky nízkým koncentracím (pod 1 mg/l) zařadit mezi tzv. stopové znečištění (Kotyza et al., 2009). Uznává se, že individuální koncentrace léčiv v přírodě jsou velmi nízké, ale zkombinované koncentrace léčiv se stejným mechanismem účinku mohou zapříčinit aditivní synergický účinek na senzitivní organismus. Léčiva jsou považována za „pseudoperzistentní sloučeniny“ v životním prostředí. Humánní a veterinární léčiva jsou kontinuálně uvolňována do prostředí nejen při výrobním procesu, ale hlavně metabolickou exkrecí z léčených jedinců (Hernando et al., 2006).

Primárním zdrojem šíření léčiv do životního prostředí jsou tak pacienti. Léčiva jsou vylučována v nezměněné formě nebo ve formě metabolitů prostřednictvím stolice nebo moči. Se splašky odchází do čistíren odpadních vod (ČOV). Zde jsou většinou nedostatečně zachycovány a tak dále přechází do recipientu, kde mohou následně působit na biocenózu. Ukázky účinnosti odstraňování léčiv v ČOV ukazují některé studie. Léky jako karbamazepin, atenolol, metoprolol, trimetoprim nebo diklofenak jsou pouze částečně odbourány a to z méně než 10%. Některá léčiva mohou být vypouštěna ve změněné formě, hydrolyzována nebo konjugována. Např. ibuprofen je takto odstraněn z více než 90% (Hernando et al., 2006). Avšak Kümmerer (2001) říká, že podle dostupných dat je biodegradace léčiv spíše výjimkou, než aby byla pravidlem. Navíc se stabilizované čistírenské kaly používají jako druhotné hnojivo na zemědělských plochách, čímž může dojít k jejich kontaminaci a následnému proniknutí odolných léčiv nebo jejich metabolitů do potravních řetězců.

Další významný zdroj jsou prošlé léky, které se do koloběhu dostávají průsakem ze skládek nebo spláchnutím do odpadu (Kotyza et al., 2009). Podle zprávy o reálné spotřebě léčiv v České republice Státního ústavu pro kontrolu léčiv ze září roku 2012 pouze polovina domácností odevzdává léky zpět do lékáren a třetina je vyhazuje do popelnic (SÚKL, 2012).

Hlavními oblastmi rozšíření tohoto znečištění v prostředí jsou:

- 1) Povrchové vody - nejexponovanější, hlavně střední a dolní toky řek, u velkých aglomerací (mnoho ČOV), výhoda dolních toků-velké naředění.
- 2) Podzemní vody - málo měření, v blízkosti skládek, kanalizace, ČOV.
- 3) Pitná voda - Prvním xenobiotikem z řad léčiv, které před 15 lety našli němečtí vědci v pitné vodě, byla kyselina klofibrová. Od té doby byla vypracována řada studií, které potvrdily kontaminaci několika různými látkami, včetně např. karbamazepinu a bezafibrátu. U nás byla zjištěna přítomnost estrogenů v nádrži Želivka v koncentraci přes 2mg/l.
- 4) Půda a sedimenty - Z aplikace stabilizovaných čistírenských kalů, může dojít k sorpci na částice půdy nebo k průchodu látek do dalších částí krajiny díky závlahové vodě či srážkám. Po sorpci může docházet k degradaci mnoha xenobiotik (Kotyza et al., 2009).

Léčiva ve vodním prostředí byla nalezena ve zpracovaných odpadních vodách, v řekách a potocích, podzemních i mořských vodách a pitné vodě. Naměřené koncentrace jsou obvykle nízké, zpravidla od ng/l po µg/l (hlavně veterinární léčiva používaná v zemědělství) (Morley, 2009).

Málo se ví o účincích a rizicích dlouhodobé expozice vodních organismů nízkými koncentracemi těchto léčiv. V roce 1995 byla detekována kyselina klofibrová a další metabolity některých humánních léčiv v kohoutkové vodě v Berlíně, v biologicky ošetřené i neošetřené odpadní vodě, povrchové vodě a velmi málo i v pitné vodě. Tento objev odstartoval další zkoumání osudu léčiv po jejich vyloučení. Veterinární i humánní léčiva byla vyvinuta tak, aby byla biologicky aktivní a měla velmi specifický účinek. Léčiva a jejich metabolity se dostávají močí a stolicí do vodního prostředí, ať už přes čistírnu odpadních vod nebo přímo sáknutím do půdy, povrchových a podzemních vod (Derksen et al., 2004).

Z environmentálního hlediska bylo dosud studováno 850 humánních, 200 veterinárních léčiv a 20 doplňkových krmných směsí a premixů. Z humánních léčiv se jedná hlavně o fibráty, beta blokátory, antiepileptika, analgetika, cytostatika, antibiotika, antidepressiva, bronchospasmolytika, kontrastní látky a hormony. U zvířat jsou často

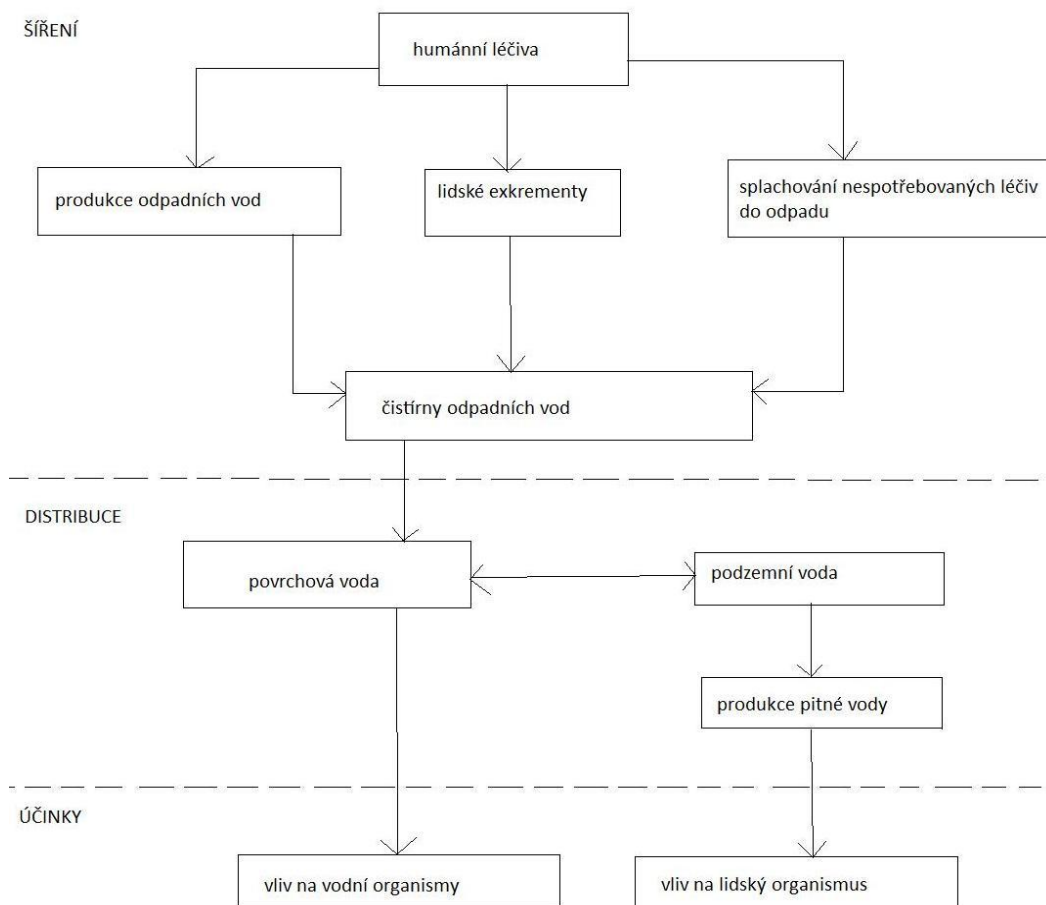
přidávány léčiva preventivně do krmných směsí (premixy) - antibiotika, léky proti kokcidióze, avšak stimulatory růstu už nejsou v EU povoleny (Derksen et al., 2004).

Cesta šíření veterinárních léčiv prostředím (Obr. 2) je složitější než u léčiv humánních (Obr. 1). Humánní léčiva vstupují do prostředí po produkci a použití, ale malé množství nespotebovaných léčiv končí v odpadu. Kvantitativně tato domácí cesta tvoří největší příspěvek. Léčiva a jejich metabolity jsou po konzumaci a exkreci močí nebo stolicí a po biologickém zpracování v čistírnách odpadních vod vypouštěny do pozemních vod. Osud veterinárních a obohacených krmiv je komplexnější. Šíření do pozemních vod může být přímé, kdy jsou zvířata chována na pastvinách nebo nepřímé skrze uvolňování a louhování z půdy. Výkaly zvířat chovaných ve stájích jsou shromažďovány a skladovány a poté rovnoměrně rozmetány na pole a louky. Během skladování může dojít k biodegradacím procesům. Rozsah uvolňování a louhování z půdy do vody závisí na klimatických, chemických a fyzikálních vlastnostech látky, druhu zvířete a zemědělských postupech. Kvůli tomu, že rozmetání hnoje se soustředí většinou do letních měsíců, je kontaminace vod závislá na ročním období, zatímco kontaminace humánními léčivy je kontinuální během celého roku (Derksen et al., 2004).

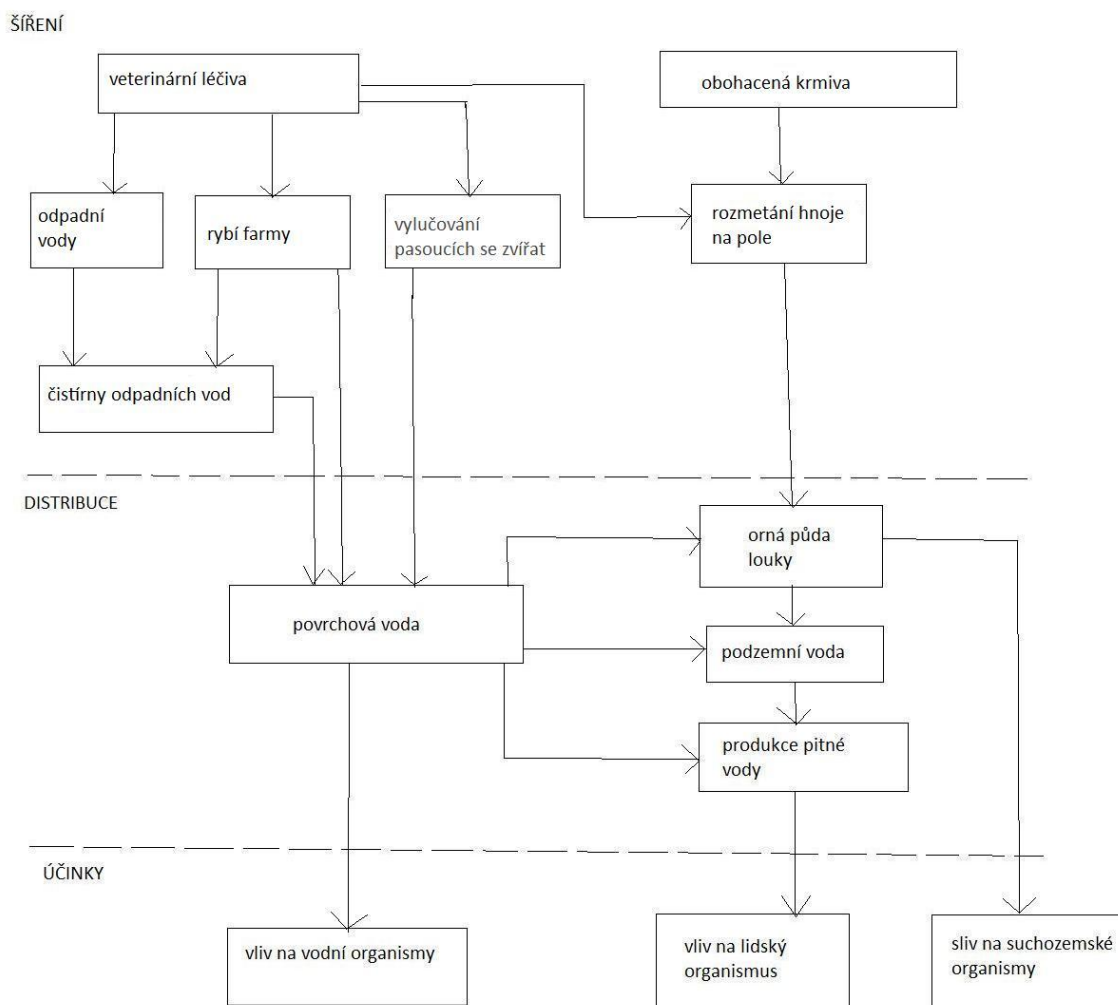
Protože jsou léčiva používána kontinuálně během celého roku, očekává se, že vodní organismy jsou vystaveny velmi nízké koncentraci humánních léčiv a jejich metabolitů dlouhodobě a po celý svůj životní cyklus. Nejsou téměř žádné nebo velmi omezené informace o přítomnosti doplňky obohacených krmiv a veterinárních léčiv v pozemních vodách. Dlouhodobá expozice vodních organismů nízkým koncentracím léčiv může mít různé negativní důsledky: 1) Ekotoxikologické účinky - Tyto mohou být dokázány běžně dostupnými biologickými testy (akutní a chronická toxicita, genotoxicita a kancerogenita). 2) Farmakologické účinky - Tyto jsou výsledkem specifických farmakologických mechanismů na necílené organismy (jako např. interference hormonů a imunitního systému). 3) Rozvoj rezistence mikroorganismů (Derksen et al., 2004).

V poslední dekádě prudce roste zájem o tzv. „emerging pollutants“. Tento termín definuje jakoukoli chemikálii, která nebyla zahrnuta v národním nebo mezinárodním monitorovacím programu, ale je kontinuálně uvolňována do prostředí díky antropogenní aktivitě. Tyto chemikálie nemusí být nutně novými látkami, avšak jejich osud v prostředí ani toxikologické studie ještě nebyly zpracovány a jejich potenciální riziko pro ekosystém nelze zanedbat. Tyto kontaminanty zahrnují

rozmanitou skupinu látek zahrnující humánní a veterinární léčiva a také jejich metabolické produkty (Horvat et al., 2012).



Obr. 1 Distribuční cesta humánních léčiv (Derksen et al., 2004).



Obr. 2 Distribuční cesta veterinárních léčiv (Derksen et al., 2004).

2.2. Ekotoxicita léčiv

Jak si lidé stále více uvědomují výskyt léčiv v životním prostředí, způsobuje to rostoucí znepokojení ohledně jejich toxicity. Přestože zdravotní riziko pro lidi o toxicitě těchto látek je veřejně dostupné, velmi málo známe o jejich ekotoxikologických účincích na živé organismy v přírodě (Horvat et al., 2012). Byly odhaleny akutní toxické účinky farmaceuticky používaných látek na rozličné druhy organismů v prostředí. Tyto účinky jsou způsobeny jejich biologickou aktivitou, bioakumulací a perzistencí. Kvůli rostoucímu zájmu vznikají směrnice hodnocení rizik farmaceuticky

aktivních látek v humánní i veterinární medicíně uvolněných do vody, vzduchu i půdy (Kar a Roy, 2010).

Téměř žádná ekotoxikologická data nejsou zatím k nalezení o vlivu aktivních látek používaných čistě jako veterinární léčiva a obohacené krmné směsi. Dlouhodobá ekotoxikologická data, která dávají vzhled do potenciálních dlouhodobých následků, jsou jen omezeně dostupná. Předpokládá se, že obecně uznávané testy akutní toxicity jsou nedostačující pro zjištění potenciálního chronického a specifického rizika pro vodní organismy i ekosystém jako takový. Je také nasnadě, že účinná látka léčiva může mít i necílený farmakologický účinek na různé organismy (Derksen et al., 2004). European Medicines Evaluation Agency (EMA) a Food and Drug Administration (FDA) představily základní principy a směrnice pro ustanovení environmentálního rizika nových i existujících chemikálií. Systém je založen na porovnávání hodnot předpokládané reálné koncentrace s nejvyšší předpokládanou možnou koncentrací určité chemikálie v prostředí odvozených ze standardních zkoušek toxicity. Koncept ustanovení environmentálního rizika je založen na sérii krátkodobých ekotoxikologických studií na 3-4 různých živočišných druzích. Avšak ustavení faktorů pro odvození chronických koncentrací, při kterých ještě není pozorován žádný účinek, je problematické. Použití různých dlouhodobých testů pro všechna léčiva a druhy je téměř nemožné, což znesnadňuje plošné hodnocení toxicity léčiv (Hernando et al., 2006). EMA navrhla koncept nové směrnice pro hodnocení environmentálního rizika. Je založena na přijatých hodnotících paradigmatech pro průmyslově chemikálie a biocidy, ale také bere v úvahu specifické vlastnosti léčiv, například použití dostupných farmakologických informací. Hodnocení rizika bylo prozatím prováděno jen na základě akutních ekotoxikologických dat a ty byly obvykle vyhodnoceny, že zde není žádné bezprostřední ohrožení. Nejnovější koncept EMA navrhuje zahrnout i farmakokinetické a farmakodynamické údaje do hodnocení rizik pro životní prostředí (Kar a Roy, 2010).

V roce 2002 byl v Holandsku zahájen monitorovací program humánních a veterinárních léčiv v životním prostředí. Zaměřili se na léčiva, která se spotřebovávají ve velkých objemech, ekotoxicky významná, špatně biodegradovatelná a pro která je dostupná analytická metoda. Získaná ekotoxikologická data by měla poskytnout informaci o environmentálním riziku. Ekotoxikologická data by měla být spojována s délkou expozice a časem, kdy se projevil určitý účinek. Zatím je nedostatek dat o ekotoxicitě, fyzikálně-chemických vlastnostech a biodegradabilitě většiny léčiv pro

kompletní posouzení rizika. Hlavně chybí data o chronické a specifické toxicitě léčiv a jejich vlivu na ekologické procesy v ekosystému (Derksen et al., 2004). Je zřejmé, že koncentrace léčiv jsou typicky velmi nízké, většinou v rozmezí nanogramů a mikrogramů. Je proto nepravděpodobné, že by tyto hladiny způsobily akutní toxicitu. Správné stanovení rizik vyžaduje zvážení kumulativních účinků léčiv – chronickou toxicitu (Jjemba, 2006).

V Evropě pro veterinární použití bylo spotřebováno celkem 5000 tun antibiotik a růstových stimulatorů při chovu a vykrmování hospodářských zvířat. Tetracykliny jsou nejčastěji používaná antibiotika v terapii a prevenci, mezi čtyřmi růstovými stimulanty je nejdůležitější monensin. Většina těchto látek se používá u prasat a drůbeže, pouze několik procent u jiných druhů (dobytek, ovce, kozy atd.). Jen v Německu je spotřebováno 900 tun těchto látek ročně. Doteď není známo, jaká část z tohoto množství skončí v povrchových vodách odtokem z obdělávané půdy po použití hnoje jako hnojiva nebo v podzemních vodách průchodem z půdy (Kümmerer, 2001).

Environmentální dopad, který má plošná anhelmintická léčba dobytka, závisí na škodlivém vlivu léčiva nebo jeho metabolitu na organismy v místě exkrece, na vyloučeném množství jeho aktivní látky, na aktuální povaze vylučování a stabilitě ekotoxických zbytků. Také se musí vzít v úvahu klimatické podmínky, živočišné osídlení, udupávání dobyt看em a narušování ptactvem, to vše má vliv na míru degradace hnoje. Největší ekotoxikologické riziko je spojeno se systémy s prodlouženým uvolňováním (McKellar, 1997). Studie například ukázaly, že některé metabolity benzimidazolových anthelmintik jsou toxičtější než původní mateřská sloučenina léčiva (Horvat et al., 2012).

Existuje velmi málo informací o stabilitě benzimidazolů ve výkalech dobytka, ale benzimidazoly jsou relativně stálé sloučeniny a je pravděpodobné, že si uchovají svou strukturální jednotu (McKellar, 1997).

2.3. Možnosti fytořemediace xenobiotik

Tisíce míst napřích industrializovaným světem je znečištěno organickými chemikáliemi v důsledku průmyslových procesů, vylití a nehod z nesprávného použití chemikálií. Pokusy odstranit nechtěné látky z prostředí zahrnují poloprůmyslové metody (vykopání a skládkování, nucené provzdušňování, použití rozpouštědel) a spalování, ale také k prostředí citlivější metody jako jsou bioremediace a fytořemediace. Právě poslední jmenovaná se stává tématem velkého zájmu, protože je udržitelná a umožňuje levný uklid zamořeného místa (Schröder et al., 2008).

Fytořemediace je technologie, která využívá rostlin k vyčištění půdy, sedimentu, povrchové a podzemní vody od toxických kontaminant. Tato metoda využívá rostliny k degradaci, stabilizaci a odstranění kontaminant životního prostředí. Fytořemediace je přírodní, esteticky půvabná nízkonákladová technologie, je sociálně akceptovatelná širokou veřejností i regulatorními orgány. Přítomnost rostlinných enzymů schopných degradovat environmentálně problematická xenobiotika může být využita ve vývoji fytořemediačních strategií. Fytořemediace organických látek je všeobecně zaměřena hlavně na rozpouštědla, ropné látky a výbušniny, poslední dobou se zaměřují i na možnost odbourávání polycyklických aromatických uhlovodíků a polychlorovaných bifenyly (Alkorta a Garbisu, 2001). Přírodní kontaminanty jsou v nízkých koncentracích, a proto by fytořemediace mohla být tou nejekonomičtější a nejúčinnější metodou řemediace prostředí. Mnoho míst s méně toxickým zamořením je vhodných pro fytořemediaci jako dlouhodobé řešení problému (Susarla et al., 2002).

Podle studií Siciliana et al. (2003) fytořemediace trvající přes dva roky snížila celkovou koncentraci ropných uhlovodíků o 30%, což je dvakrát víc než na zelení nepokrytých půdách. Terénní studie od Nedunuri et al. (2000) na místě zamořeném ropou ukázala 42% pokles ropných uhlovodíků s použitím jílku (*Lolium multiflorum*), 50% pokles u trávy *Stenotaphrum secundatum* po 21 měsících. U jiné zkoušky byl během 60 dní odstraněn z 96% 2,4,6-trinitrotoluen pomocí kukuřice (*Zea mays*) (Van Dillewijn et al., 2007).

Stoupající industrializovaná globální ekonomika posledního století vedla k dramatickému zvýšení vypouštění antropogenních chemikálií do prostředí. Ačkoli bylo použití rostlin k řemediaci radionuclidů znečištěné půdy prozkoumáváno už v padesátých letech dvacátého století, termín „fytořemediace“ nebyl používán až do let

osmdesátých a rychlý rozvoj této oblasti začal až v posledních deseti letech. Fytoremediace se objevila jako slibná technika pro in situ ozdravení prostředí (Gerhardt et al., 2009).

Je důležité rozlišovat mezi fytoremediací prvků a organických látek. Elementární znečištění je v zásadě neměnné žádným biologickým ani fyzikálním procesem kromě jaderného štěpení a fúze. Zahrnuje hlavně těžké kovy a radionuklidy, jako arsen, kadmium, cesium, chrom, olovo, rtuť, stroncium, technecium, tritium a uran. Až na pár výjimek nejlepší scénář odstranění fytoremediací zahrnuje extrakci a translokaci těchto prvků do nadzemních částí rostliny pro pozdější slizeň, dále je možnost přeměny na méně toxickou formu nebo izolace prvku v kořenech, aby se dále neuvolňoval do prostředí. Pro organické polutanty je hlavním cílem fytoremediace kompletně je mineralizovat na netoxické sloučeniny jako oxid uhličitý, dusičnany, chlor a amoniak. Polutanty mohou být v rostlině remediovány několika biofyzikálními a biochemickými procesy: absorpce, transport, translokace - hyperakumulace nebo přeměna a mineralizace. Relativně málo známe o sekvestraci toxických organických látek v kořenech rostlin a o jejich koncentraci ve vakuolách (Meagher, 2000).

Mnoho experimentů poskytlo informace o jednotlivých typech a specifických mechanismech fytoremediace organických sloučenin. Některé sloučeniny mohou být transportovány přes rostlinné membrány. Látky s nízkou molekulovou hmotností mohou být často odstraněny z půdy a vypouštěny listy pomocí evaporace a transpirace rostlin (fytovolatilizace). Některé netěkavé látky mohou být degradovány nebo se stávají netoxické enzymatickými přeměnami a sekvestrací v rostlině (fyto-degradace, fytoextrakce). Jiné sloučeniny jsou stabilní a jsou odstraňovány spolu s biomasou např. spalováním. Problém je, že vysoké koncentrace kontaminantů mohou inhibovat růst rostlin či růst kořenů (Gerhardt et al., 2009).

Proces, kterým rostliny podporují remediaci chemického a toxického odpadu zahrnuje:

- 1) modifikaci fyzikálních a chemických vlastností znečištěné půdy,
- 2) uvolňování kořenového exudátu a tím nárůst organického uhlíku,
- 3) zlepšení provzdušnění uvolněním kyslíku do kořenové zóny a zvýšení porozity horní vrstvy půdy,
- 4) zachycení a zpomalení pohybu chemikálií,
- 5) uskutečnění metabolické součinnosti mikrobů a rostliny při biotransformaci,

6) snížení horizontální a laterální migrace polutantů do podzemních vod nasátím dostupné vody a obrácením hydraulického gradientu (Susarla et al., 2002).

Metabolická kaskáda detoxifikace, rozkladu a skladování organických xenobiotik byla poprvé popsána v roce 1979 (Shimabukuro et al.). Byla rozdělena do tří fází: I. konverze xenobiotika, II. detoxifikace a III. exkrece, v analogii k lidskému jaternímu metabolismu. Nejdříve dochází v I. fázi k reakcím oxidačním (katalyzovanými hlavně cytochromy P450 a peroxidasami), redukčním nebo hydrolytickým. Ve fázi II dochází ke konjugaci xenobiotika s endogenní sloučeninou (např. pomocí glutathiontransferasy a UDP-glukosyltransferasy), čímž se stává sloučenina méně toxická. Fáze III může být rozdělena na transport a uskladnění ve vakuole nebo vazbu na buněčnou stěnu a exkrece (Schröder et al., 2008).

U rostlin, hub a bakterií najdeme celou škálu degradačních enzymů. Obsahují peroxidasy, dioxygenasy, P450 monooxygenasy, laccasy, fosfatasy, dehalogenasy, nitrilasy a nitroreduktasy. Ačkoli některé druhy umí zcela degradovat určitou organickou kontaminantu, samostatné druhy zpravidla neobsahují celou degradační cestu. Nicméně společenství mikrobů a rhizosféry pracuje v tandemu a efektivně odstraňuje tyto sloučeniny (Gerhardt et al., 2009).

Potenciální použití transgenních rostlin a mikroorganismů při remediaci je široce zkoumáno v laboratořích. Například vložení genů kódujících biosyntetickou cestu biosurfaktantu vedlo ke zvýšení biodostupnosti kontaminantu pro mikroby a kořeny. Vnesení či úprava genů mikrobům nebo rostlinám může zvýšit rezistenci na polutanat nebo přírodní stresory, zvýšit expresi genů pro enzymy činné v degradačních cestách, uvolnit specifické exudáty, indukovat degradační procesy rhizomikrobů, zvýšit schopnosti příjmu, transportu a sekvestrace kontaminant. Bohužel, zvláště v Evropě, má veřejnost jen malé pochopení pro genetické inženýrství (Gerhardt et al., 2009).

Fytoremediace má řadu výhod i nevýhod, některé jsou uvedené v tabulce 1. Je také třeba vzít v potaz ekologické riziko zavlečení nepůvodních druhů rostlin a mikroorganismů do prostředí. Tyto druhy se mohou rozšířit z původního stanoviště a křížit se s původními druhy (Gerhardt et al., 2009).

Tab. 1 Výhody a omezení fytořediace (Susarla et al., 2002).

Výhody	Nevýhody
in situ	omezení na mělkou horní vrstvu vody, půdy a sedimentů
pasivní	vysoké koncentrace mohou být toxické pro rostliny i zvířata, co je konzumují
solární pohon	omezení transferu množstvím
nízké finanční náklady (10-20% oproti mechanickému ošetření)	pomalejší než mechanické ošetření
rychlejší než přirozený ústup	účinné jen pro středně hydrofobní sloučeniny
veřejná akceptace	toxicita a biodostupnost biodegradačních produktů není známa
méně vzdušných a vodních emisí	kontaminanty mohou být mobilizovány do podzemních vod
uchovává přírodní zdroje	ovlivnění půdními a klimatickými podmínkami

2.3.1. Hlavní druhy a mechanismy fytoremediace

Některé mechanismy rostlin usnadňující remediaci jsou: fytoextrakce/fytoakumulace, hydraulická kontrola, fytostabilizace, fytotransformace/degradace, fytovolatilizace a rhizodegradace. Existují četné způsoby mechanismů, kterými rostliny ozdravují znečištěné prostředí. Některými faktory, které ovlivňují chemický příjem a distribuci chemikálií rostlinou jsou: 1) fyzikální a chemické vlastnosti dané sloučeniny (např. rozpustnost ve vodě, tlak vodní páry, molekulová hmotnost, rozdělovací koeficient voda/oktanol, atd.); 2) charakteristiky prostředí (teplota, pH, organická hmota, obsah vlhkosti v půdě); 3) vlastnosti rostliny (typ kořenového systému, druhy enzymů) (Susarla et al., 2002).

Fytoremediaci lze dělit na *in situ*, *in vivo* a *in vitro*:

In situ fytoremediace zahrnuje umístění rostlin na kontaminované místo, povrch vody, půdu nebo sediment. Pokud remediace spočívá pouze v příjmu a akumulaci chemikálie, rostliny jsou poté sklizeny a odvezeny k likvidaci nebo znovuzískání původních chemických látek. Tento přístup je zpravidla nejlevnější fytoremediační strategií.

In-vivo fytoremediace s přemístěním kontaminant je vhodná pro místa, která nejsou přístupná pro rostliny, například v hlubokých vrstvách. Při této metodě je kontaminované místo mechanicky vyjmuto, transportováno do místa čištění, kde je vystaveno působení rostlin optimálních pro dané znečištění. Po očištění může být voda nebo půda vrácena na své původní místo a rostliny posekány a odstraněny, pokud je to nutné. Tento postup je o něco dražší.

In vitro fytoremediace se provádí prostřednictvím rostlinných součástí, jako jsou extrahované enzymy. Tento přístup může být také použit u kontaminovaného materiálu, který byl dočasně přemístěn do oblasti ošetřování (Susarla et al., 2002).

Většina pokusů stanovující vhodné fytoremediační techniky využívala normální v půdě rostoucí rostliny, případně hydroponie. V poslední době je stále více usílí směřováno k výzkumu pro pochopení a zlepšení výkonnosti fytoremediačních technik. Rychle narůstá počet výsledků, kterých bylo dosaženo s pomocí *in vitro* buněčných a tkáňových kultur (Macek et al., 2000).

Způsoby fytoremediace se dělí na:

- **Fytoextrakce** je odstanění kontaminanty z půdy, podzemní nebo povrchové vody pomocí živých rostlin. **Fytoakumulace** se objevuje, když je kontaminanta rostlinou přijímána, ale není rychle nebo zcela odbourána, což se projeví právě hromaděním v těle rostliny. Některé rostliny hyperakumulují kovy (např. nikl, zinek, měď, chrom) a radionuklidy. Hyperakumulace těžkých kovů je definována obsahem více než 0,1% ze suché váhy pletiva rostliny. Pokud je cílem remediace sklídit tyto rostliny, které akumulují kontaminanty, je žádané, aby tyto rostliny byly schopné přemístit kontaminantu z kořenů do horních nadzemních částí rostlinného těla, jako jsou výhony a listy.
- Při **hydraulické kontrole** jsou rostliny používány jako organické pumpy, které nasávají velké objemy kontaminované vody jako součást transpiračního procesu. Navíc k příjmu kontaminanty rostlinou, docílíme i snížení pohybu kontaminant v podzemní vodě. Nejlepší pro tento účel jsou rostliny, co jsou schopné nasávat velké množství vody z půdy. Například vrba (*Salix* spp.) může spotřebovat až 200 litrů vody za den.
- **Fytostabilizace** je dalším mechanismem, který lze použít k minimalizaci pohybu kontaminant v půdách. Tento proces využívá toho, že kořeny rostlin jsou schopné měnit environmentální podmínky půdy, jako je pH a obsah vlhkosti. Mnoho kořenových exsudátů způsobuje precipitaci kovů.
- Eliminace kontaminanty z prostředí může být provedena cestou **fytoodegradace** a **fytotransformace** pomocí rostlinných enzymů a jejich kofaktorů. Enzymy zvláštního významu obsahují: dehalogenasy (přeměna sloučenin obsahujících chlor), peroxidasy (transformace fenolických sloučenin), nitroreduktasy (přeměna výbušnin a dalších nitrosloučenin), nitrilasy (transformace aromatických sloučenin s kyanidovou skupinou), fosfatasy (přeměna organofosfátových pesticidů).
- **Fytovolatilizace** je mechanismus, kterým rostliny přeměňují kontaminanty do těkavé formy. Některé transgenní rostliny (např. *Arabidopsis thaliana*) dokáží přeměnit organické a anorganické soli rtuti na těkavou elementární formu.
- **Rhizodegradace** je biologické ošetření kontaminanty zvýšenou bakteriální a houbovou aktivitou uvnitř rhizosféry určitých cévnatých rostlin. Rhizosféra je místem zvýšené mikrobiální hustoty a aktivity na povrchu kořene. Rostliny mohou ovlivňovat geochemické prostředí rhizosféry, zajišťovat ideální podmínky pro růst bakterií a hub a tím degradovat organické znečištění.

V mnoha případech fytoremediace zahrnuje **kombinace** výše popsaných mechanismů. Například fytoextrakce a fytovolatilizace má zásluhu na odstranění přebytečného selenu v půdě (Susarla et al., 2002).

Fytoremediační postupy jsou v současnosti rozsáhle studovány a vyvíjeny. Velmi účinnou se v mnoha případech ukázala rhizoremediace, která zahrnuje jak rostliny tak přidruženou mikrobiální rhizosféru, buď přirozeně se vyskytující nebo záměrně podněcovanou zavedením specifických mikroorganismů. Tyto mikrobi mohou buď rozkládat znečišťující látky nebo podporovat růst rostlin ve stresových podmínkách. Protože počáteční výzkum ukázal velký příslib této cenově přijatelné a účinné remediační technologie, je vyvinuto podstatné úsilí pro přesun těchto metod z laboratoře do běžné komerční praxe. Rhizoremediace je jednou z nejefektivnějších prostředků, kterým rostliny remediují organické sloučeniny, hlavně ty velké špatně odbouratelné. Komplexní interakce zahrnující kořeny, kořenový exudát, půdu rhizosféry a mikrobi vyústí v degradaci organických sloučenin na netoxické nebo alespoň méně toxické. V půdách obsahujících velké objemy kořenů může mikrobiální populace dosáhnout až titru 10^{12} buněk/gram hlíny. Odhadovaná cena skládkování nebo spalování je mezi 200-1500\$ za tunu, což je mnohem více v porovnání s odhadovanou cenou rhizoremediace (10-50\$/tunu) (Gerhardt et al., 2009).

2.4. Použité rostliny

2.4.1. Rákos obecný (*Phragmites australis*)



Rákos obecný je mnoholetá bylina, kvetoucí od srpna do září (Čelakovský, 1896). Nalezneme ji v mokřadech mírných i tropických po celém světě. Rákos patří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Mnohdy se rozrůstá značně invazivně. Rákos je 1 až 4 m vysoký s dlouhými, plazivými oddenky a až 10 m dlouhými výběžky. Stébla jsou mohutná, přímá, tuhá, lysá, až 25 mm v průměru, s mnoha kolénky. Listy jsou četné, 20 až 50 cm dlouhé a 2 až 3 cm široké, zelené, někdy namodralé, tuhé, ploché, na konci protažené v dlouhou, tenkou a mírně zvlněnou špičku. Listové pochvy kryjí kolénka, jazýček je nahrazen krátkými chlupy, ouška jsou krátká a slabě chlupatá. Květní lodyhy jsou zpočátku přímé, později převislé, 15 až 40 cm dlouhé, často nafialovělé, jejich větve jsou drsné, na bázi jemně chlupaté. Klásky jsou dvou až sedmikvěté, 10 až 15 mm dlouhé, ve spodní části pouze s květy samčími nebo sterilními, v horní části oboupohlavnými, z větve vyrůstají až 10 mm dlouhé, lesklé chlupy. Pluchy jsou úzké a zašpičatělé, na bázi s hedvábnými chlupy, osina chybí. Kvete od července do října. Jedná se kosmopolitní druh, roste takřka po celém světě vyjma arktických oblastí, v ČR se vyskytuje hojně od nížin po podhorské oblasti, ve vyšších polohách obvykle nekvete. Preferuje stojaté nebo velmi pomalu tekoucí vody (koření ve hloubkách zhruba do 1 m), prameniště, vlhké louky, bažiny, podmáčené lesy, někdy i sušší stanoviště s kamenitou půdou (opuštěné pískovny apod.) (Botanika.Wendys). Rákos obecný je velmi důležitý pro zachování přirozeného prostředí pro zvěř a rostlinstvo, hlavně v Evropě a Asii, kde je mnoho druhů ptáků silně vázáno na jeho velká stanoviště (např. sýkořice vousatá (*Panurus biarmicus*), rákosník obecný (*Acrocephalus scirpaceus*), bukač velký

(*Botaurus stellaris*). Rákos totiž obecně tvoří rozlehlá společenstva (známá jako rákosiny), která mohou zaujímat 1 km², ale i více. Rákos je schopen reprodukce semeny, ale primárně se rozmnožuje nepohlavně pomocí oddenků. Toto vegetativní šíření může vést k vytvoření hustého porostu klonů s více než 200 stonky/m² (InvasivePlants). Rákos je velkou trvalou trávou žijící u jezer a řek nebo v brakických mokřadech, roste po celém světě od mírného po tropické podnebí. Tento druh preferuje eutrofní a stojaté vody a toleruje střední salinitu (až 45g/litr) (Bonanno a Giudice, 2010).

Rákos obecný je jedním z nejméně používaných druhů mokřadních rostlin k fytoremediaci vody, díky své kapacitě absorpce a toleranci na kontaminované prostředí (Bonanno a Giudice, 2010). Voda protéká skrz umělý mokřadní systém rákosin, kde působí bakterie na povrchu kořenů a opadaných listů a odstraňují některé živiny biotransformací. Detoxifikační kapacita rákosu nebyla prozatím nějak hluboce zkoumána, i přestože mnoho umělých rákosin se zdá velmi úspěšných v ozdravování půdy a vody od xenobiotik. Rákosové rostliny na přirozených stanovištích i místech, kde byly uměle vysazeny k čištění vody po celé Evropě, jsou schopné nasávat organická xenobiotika a herbicidy z vody. Po příjmu, musí dojít k rychlé detoxikaci polutantu, aby nedošlo k poškození ostatních živých pletiv (Schröder et al., 2008).

2.4.2. Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)



Huseníček rolní byl objeven Johannesem Thalem v horách Harz v 16. století, v té době byla nazývána *Pilosella siliquosa* a od té doby prošlo jeho jméno mnohými změnami. Huseníček je malá kvetoucí rostlina široce využívaná jako modelový organismus. Náleží do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Huseníček nemá zvláštní zemědělské využití, ale s výhodou se využívá pro základní výzkum v genetice a molekulární biologii. V rostlinné biologii představuje základní modelový organismus, podobně jako myš a drosophila v biologii živočišné (Wikipedia).

Huseníček je rozšířen skoro v celé Evropě (kromě severní Skandinávie a nejsevernějších oblastí evropské části Ruska), vyskytuje se též na Kanárských ostrovech, při pobřeží Malé Asie, na Kavkaze, v jihovýchodní části Střední Asie, v severní a východní Africe. Sekundárně také na Azorských ostrovech, v jižní Africe, střední Číně, Japonsku, Severní Americe, Austrálii. U nás je hojný, v horských oblastech se však vyskytuje jen vzácně. Roste na polích, úhorech i rumištích, při okrajích cest, na železničních nádražích, na skalnatých a kamenitých svazích a náspech, v pásmu od nížin až do hor. Kvete od dubna do května, později i od srpna do října.

Je to jednoletá nebo ozimá bylina, 5–30 cm vysoká, lodyhy jsou přímé, často větvené, lysé, modravě ožíněné, přizemní listy vyrůstají v růžici, jsou obkopykaté až kopist'ovité, 1–3 cm dlouhé, lodyžní listy jsou úzce eliptické, zúženou bází přisedlé. Květy jsou bílé, korunní lístky 2–4 mm dlouhé, na bázi bledě žluté. Plodem je šikmo odstálá až rozložitá šešule, 8–18 mm dlouhá (Hoskovec, 2007).

V roce 2000 se stal první rostlinou, jejíž genom byl kompletně nasekvenován (Hoskovec, 2007). Malý jaderný genom obsahuje 157 milionů párů bazí a má přibližně 27000 genů (Wikipedia). Pro její využití ve vědě je výhodný její krátký životní cyklus

(asi 6 týdnů od vyklíčení po dozrání semen), bohatá tvorba semen a snadná kultivace v omezeném prostoru (*Arabidopsis*).

2.5. Umělé mokřadní systémy a role rákosu

Díky rostoucí hustotě osídlení a důsledkům lidské aktivity zůstává znečištění hlavním problémem pro ochranu kvality vody a biodiverzity v urbanistických oblastech. Je zde široká škála technologií, které jsou využívány k čištění odpadní vody. Mnoho regionů, ale nemá čističky nebo kvůli nedostatečné kapacitě a vysokým nákladům nečistí veškerý odpad. Z důvodu nízkého pokrytí čištění se často odpadní voda z měst a průmyslu vypouští přímo do vodního prostředí bez ošetření.

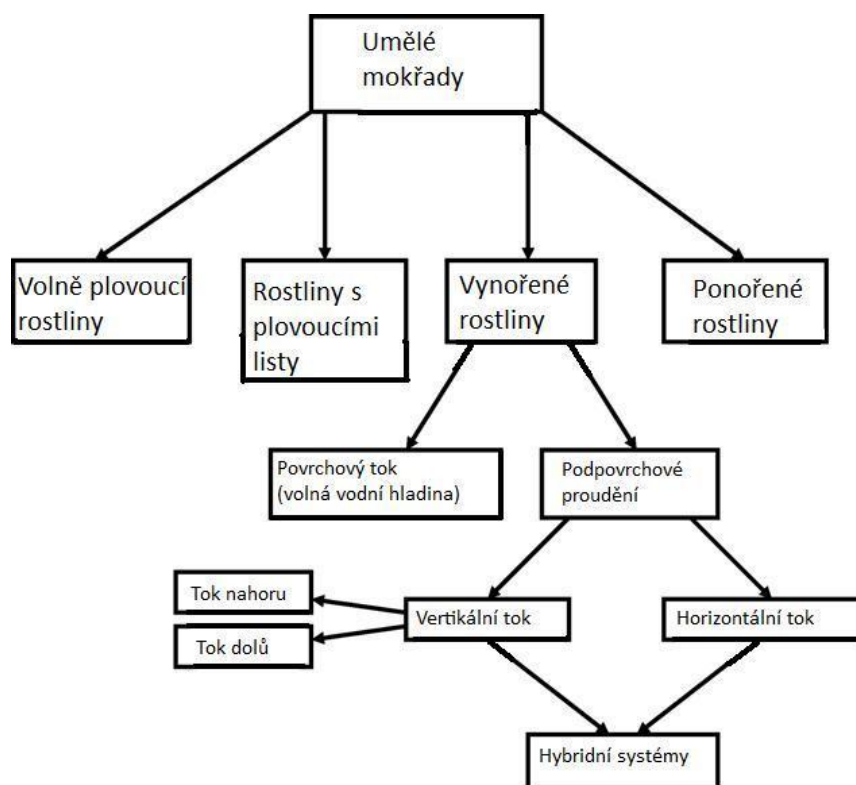
Mokřady jsou známé jako jedny z nejvíce produktivních ekosystémů světa. Bezpočet druhů ptáků, savců, plazů, obojživelníků, ryb a bezobratlých závisí na vodě a vegetaci v biotopu mokřadů. Mokřady také přímo a nepřímo podporují obyvatele zajišťováním ekosystémových služeb jako je snižování povodní, zajištění obživy a zdroje čisté vody. Poskytují estetickou krásu krajiny, edukaci, rekreační možnosti a způsobují pokles uhlíku. Schopnost zároveň dosáhnout kvalitní vody a rozšířit biodiverzitu generuje zvýšený zájem o konstrukci a obnovu mokřadů pro čištění odpadních vod. Umělé mokřadní systémy jsou vytvořeny tak, aby zachycovaly odpadní vodu a odstraňovaly z ní různé polutanty před vypuštěním do přírodních vodních těles. Napodobují přírodní mokřadní ekosystémy tím, že kombinují fyzikální, chemické a biologické procesy ke kontrolovanému a účinnějšímu zkvalitnění vody. Umělé mokřady (UM) jsou celosvětově využívány jako nízkonákladová alternativa ke konvenčnímu čištění odpadních vod (Hsu et al., 2011). Konvenční UM využívající rákos existují už 20 let. Ale tyto UM nezískaly mnoho popularity, kvůli požadavkům na velkou plochu, zanášení rákosin a potřebě počáteční investice. V posledních letech se vynořuje nová technologie využívající vodní makrofyty, hlavně *Phragmites* spp. pro domácí ošetření odpadních vod a získává na pozornosti od té doby, co nabízí alternativní rentabilní a ekologický přístup (Valipour et al., 2009).

Mokřady jsou přechodovými zónami mezi souší a vodou a vyznačují se vlhkou půdou, rostlinami, které jsou vlhkomilné a vodním podložím, které udržuje tyto

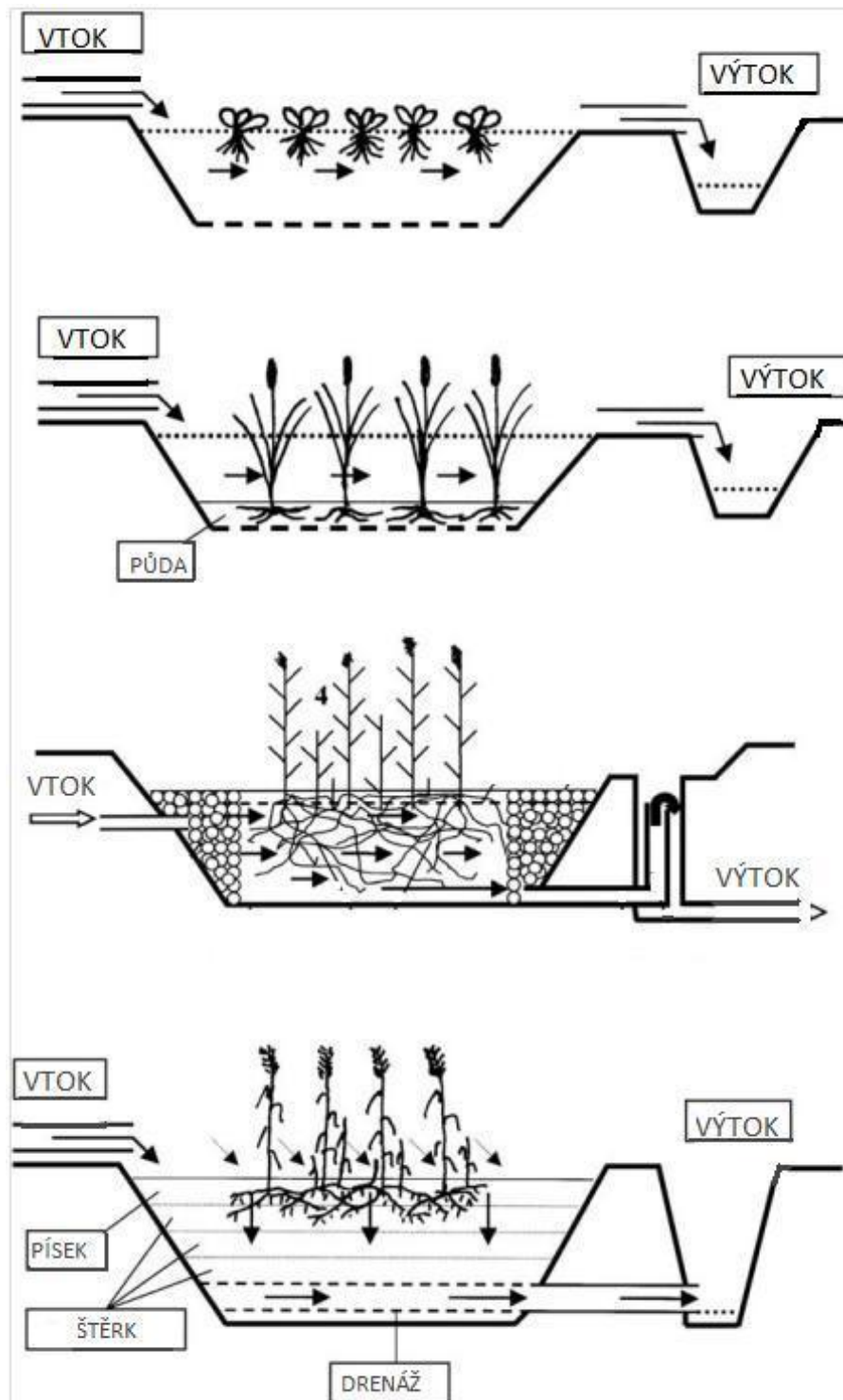
podmínky. Na základě převládajících rostlin, mohou být mokřady klasifikovány do tří skupin: slané a sladkovodní mokřiny, močály a bažiny. Mokřiny jsou zaplavované oblasti, kterým dominují dřevnaté rostliny a stromy tolerující vodu, močálům dominují byliny a bažinám mechy a rostliny preferující kyselé půdy (Kivaisi, 2001).

UM jsou často budovány pro ošetřování odpadní vody, aby zmírnily nepříznivé účinky organického znečištění v potocích a řekách způsobené přítokem městské odpadní vody. Bylo ale provedeno jen málo analýz biodiverzity a ovlivňujících faktorů, co mají vliv na fungování ekosystému UM (Hsu et al., 2011).

UM jsou navrženy a postaveny tak, aby využily přirozené procesy zahrnující vegetaci, půdu a přidružené mikrobiální uskupení k čištění odpadní vody. Základní klasifikace je obvykle založena na režimu průtoku vody (Obr. 3) Práce Jana Vymazala (2007) pracuje pouze s mokřady s volně plujícími rostlinami (FFP), s volnou vodní plochou s vynořenými rostlinami (FWS) a umělými mokřady s podpovrchovým horizontálním (HSSF) a vertikálním (VSSF) prouděním (Obr. 4).



Obr. 3 Klasifikace umělých mokřadních systémů (UM) pro čištění odpadních vod (Vymazal, 2007).



Obr. 4 Umělé mokřadní systémy (UM) pro čištění vody (odshora dolů): UM s volně plujícími rostlinami (FFP), UM s volnou vodní plochou s vynořenými rostlinami (FWS), UM s podpovrchovým horizontálním (HSSF) a vertikálním (VSSF) prouděním (Vymazal, 2007).

Vegetace je základním komponentem každého UM. Mezi běžně používané rostliny patří rákos (*Phragmites* spp.), orobinec (*Typha* spp.), sítina (*Juncus* spp.) a skřípina (*Scirpus* spp.). Avšak nejběžnější celosvětově je právě rákos obecný (*Phragmites australis*) (Lee a Scholz, 2007). Provozní faktory UM ovlivňují růst rostlin a extrémní podmínky pramenic z odpadních polutantů působí na přežití rostlin. Aby se zlepšila výkonnost, účinnost a stabilita UM, jsou v posledních letech studovány interakce rostlin s různými polutanty odpadních vod. Intenzivně se sleduje akumulace veterinárních antibiotik v některých rostlinách (sojové boby, rýže, salát, vojtěška, oves, pšenice). Prokázalo se, že rostliny umí shromažďovat antibiotika skrze vodní transport a pasivní absorpci. Vysoké hladiny antibiotik ve vodě a půdě mohou působit toxický vliv na růst rostlin a jejich biochemickou aktivitu (Liu et al., 2013). Rostliny rostoucí na UM pro čištění odpadních vod musí být toleratní k extrémním chemickým podmínkám, jako je velké množství kovů, živin a organického uhlíku. V případě průsakové vody ze skládek se setkávají kořeny rákosu s velmi vysokými hladinami amoniaku, draslíku, sodíku, železa a ostatních kovů. V těchto podmínkách narůstá zájem o jeho růst, zdravou funkci rhizosféry, akumulaci kovů v pletivech a maximalizaci očištění vody. Proto se zkoumají odpovědi rákosu v UM (Peeverly et al., 1995). Rákos dokáže odolat extrémním podmínkám prostředí, zahrnující přítomnost toxických kontaminant jako jsou těžké kovy. Proto je *Phragmites australis* široce využíván v UM k čištění městských i průmyslových odpadních vod obsahujících kovy (Bonanno a Giudice 2010). Pasivní čistící systémy a zvláště UM jsou rozsáhle používány k čištění odpadní vody z dolů s proměnlivým pH a chemickým složením posledních 10-20 let (Batty a Younger, 2004).

Navíc použití UM bylo uznáno jako ekologicky akceptovatelná ekotechnologie zvláště prospěšná pro malá městečka a průmyslové závody, které si nemohou dovolit konvenční způsoby ošetření vody. UM jsou energeticky udržitelné, protože používají pouze přírodní energii ke snižování polutantů. V porovnání s konvenčními čistícími technikami odpadních vod vyžaduje tento způsob jen nízké konstrukční a udržovací náklady. UM s volnou vodní plochou (FWS) může napodobovat přirozené systémy tím, že voda protéká a je filtrována hustou spleť vodních rostlin. Alternativní systém, známý jako UM s podpovrchovým prouděním, sestává z vyhloubené mělké nádrže se šterkem a rostlinami. Současně je na světě tisíce těchto UM přijímajících a čistících odpadní vodu z různých zdrojů. Rákos obecný prokázal, že dokáže dobře přežít a rozmnožovat se v UM čistících průmyslovou odpadní vodu v Taiwanu. Výsledky z této studie indikují,

že UM jsou schůdnou a nákladově efektivní alternativní technologií, která může nahradit tradiční sekundární biologický systém čištění v čištění průmyslové odpadní vody a plní současné standardy vyžadované v Taiwanu. A tak se mohou UM stát ekonomicky akceptovatelným řešením pro průmyslové čištění vody i v rozvojových zemích (Chen et al., 2006).

Na rozdíl od konvenčních čistících systémů jsou UM nízkonákladové, snadno zřiditelné a udržovatelné, a mají velký potenciál v aplikaci v rozvojových zemích, hlavně malými venkovskými obcemi. Ačkoli tyto systémy ještě nenalezly běžně rozšířené použití kvůli malému povědomí, odborníci rozvíjejí technologii na lokální bázi. Znovupoužití odpadních vod je důležitou strategií pro zachování vodních zdrojů, zvláště v oblastech, které trpí jejím nedostatkem. Tento postup byl také zhodnocen v rozvojových zemích včetně Maroka, Tunisu, Egypta, Súdánu, Namibie, Indie a Číny, kde jsou splašky používány k zavlažování zeleniny a dalších plodin a na podporu při chovu ryb. Ve většině rozvojových zemí existuje velmi málo zařízení k ošetřování odpadních vod (Kivaisi, 2001).

Ve studii dvoustupňového UM osázeného druhu *Typha latifolia* a *Phragmites australis* sledující odstraňování kontaminant se zaměřením na organické zatížení a rozvoj rostlin bylo zjištěno, že rákos vykazoval větší úspěšnost, ačkoli orobinec také prokázal dobrou rezistenci ke změnám. Rákos je známý jako nejvíce používaná rostlina světa v UM s podpovrchovým prouděním. Calheiros et al. (2009) provedli testy toxicity, aby zjistili účinek odpadních vod z koželužského průmyslu na jeteli lučním (*Trifolium pratense*), orobinci širokolistém (*Typha latifolia*) a rákosu obecném (*Phragmites australis*) a vyšší klíčivost byla dosažena u rákosu. Mimo to tato rostlina má vysoký potenciál vázat a akumulovat chrom, zajímavá to charakteristika pro koželužství v období, kdy je zvýšený zájem o výskyt těžkých kovů v životním prostředí. Rostliny nevykazují viditelné známky fytotoxicity, ale jejich výška je nižší v porovnání s jedinci nalezenými v jejich přirozeném prostředí (Calheiros et al., 2009). Rákos obecný a chrastice rákosovitá (*Phalaris arundinacea*) jsou dvěma nejběžněji používanými rostlinnými druhy v UM pro čištění odpadních vod v České republice. Tyto rostliny jsou používány na jednotlivých stanovištích, ale často jsou také vysazovány v pruzích kolmých na proudění vody (Vymazal a Kröpfelová, 2005).

Procesy, které ovlivňují odstraňování nebo retenci dusíku během čištění odpadních vod v UM, jsou rozličné a zahrnují volatilizaci amoniaku, nitrifikaci, denitrifikaci, fixaci dusíku, příjem rostlinou a mikroorganismy, mineralizaci a redukcí

nitrátu na amoniak, anaerobní oxidaci amoniaku, fragmentaci, sorpci, desorpci, ukládání a vyluhování (Vymazal, 2007).

Během března 2006 až června 2008 bylo měsíčně měřeno odstraňování 34 stopových prvků ve třech UM s horizontálním prouděním v České republice (Mořina, Břehov, Slavošovice). V zásadě výsledky značily široké rozmezí účinků v odstranění mezi sledovanými prvky. Nejvyšší stupeň vyloučení (v průměru 90%) měl hliník. Vysoký průměr byl také zaznamenán i pro zinek (78%). Prvky odstraněné z 50-75% byly uran, antimon, měď, olovo, molybden, chrom, barium, železo a galium. Odstraňování kadmia, cínu, rtuti, stříbra, selenu a niklu se pohybovalo mezi 25-50%. Nízká retence (0-25%) byla pozorována u vanadu, lithia, boru, kobaltu a stroncia. Byly zde také dva prvky (mangan a arsen), u kterých byla průměrná koncentrace na výstupu vyšší než na vstupu do systému (Kröpfelová et al., 2009).

Nicméně spolehlivé čištění je často odvislé od klimatických podmínek, rozhodnutí o návrhu, konstrukčního výběru, provozu a údržby. Je často velmi složité pro návrháře, inženýry a řízení nalézt důvod, proč určitý umělý mokřadní systém nefunguje. Selhání UM se často objevuje, pokud se mokřad zanesle a jsou vytvořeny náhradní cesty průtoku. Výsledkem může být snížení účinnosti očisty nebo dojde k úniku odpadní vody ze systému. Zanesení může být způsobeno ukládáním organických a anorganických pevných látek, které vytvářejí biologické podloží vedoucí k vnějšímu zablokování půdních pórů nebo vytvoření ledových zábran ve studeném období. Ucpané mokřady mohou vytvářet jiné preferenční směry proudění, zkratky a zápach (Muñoz et al., 2006).

2.6. Anthelmintika

Anthelmintika jsou léčiva určená k terapii helmintóz, tedy léčbě nálezů lidí i zvířat způsobených cizopasnými červy. Anthelmintika působí různými mechanismy a mohou helminty přímo usmrctvat, paralyzovat nebo inaktivovat (Opletalová, 2006). Nejčastějšími původci infestace lidí u nás v České republice jsou tasemnice bezbranná a dlouhočlenná (*Taenia saginata*, *T. solium*), roup dětský (*Enterobius vermicularis*), škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) a motolice jaterní (*Fasciola hepatica*). Zvířata jsou hostiteli červů, jejichž vývojové cykly probíhají ve vnitřním prostředí hostitele nebo mezihostitele (biohelmintózy), nebo výhradně v životním prostředí (geohelmintózy). Vztah červa a hostitele je vztahem parazitickým. Choroby způsobené červy jsou aktuální u všech obratlovců, negativními projevy parazitace zvířat jsou nepřímé i přímé ztráty v jejich užitkovosti (chovatelská, produkční, reprodukční). Mnohé helmintózy jsou i zoonózami. Prevence a léčba helmintóz zahrnuje kombinaci zoohygienických opatření a využívání velmi rozsáhlé skupiny značně různorodých léčiv s anthelmintickými účinky (Lamka a Ducháček, 2008).

Ve vyspělých státech helmintóz u lidí ubývá a tak jsou anthelmintika hlavně doménou veterinární a tropické medicíny. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou v rozvojových zemích až závratné 2 miliardy lidí nakažených parazitickými červy. Navzdory vysoké prevalenci parazitických onemocnění je vývoj nových anthelmintik relativně pomalý. Důvod je jednoduchý: národy, které trpí nejvíce tropickými parazitózami, nemají peníze na investice na jejich výzkum a vývoj. Proto není překvapující, že dostupná humánní léčiva byla nejprve vyvíjena pro účely veterinární medicíny. V současnosti je k dispozici jen úzký repertoár chemoterapeutik použitelných pro léčbu helmintóz u lidí (Holden-Dye a Walker, 2007).

Parazitičtí červi také napadají hospodářská zvířata a plodiny, což vyúsťuje ve výrazné snížení ekonomické produkce. Samozřejmě je významná i parazitická nákaza domácích zvířat. I ve vyspělých státech, včetně České republiky, jsou helmintózy zvířat běžné a s velmi širokým spektrem původců. Mezi původce helmintóz u zvířat patří například škrkavka psí (*Toxocara canis*), škrkavka kočičí (*T. cati*), vlasovec (*Dirofilaria* spp.), tenkohlavec (*Trichuris* spp.), měchovec (*Uncinaria*, *Ancylostoma* spp.), tasemnice hrášková (*Taenia pisiformis*), tasemnice vroubená (*T. hydatigena*), tasemnice ovčí (*T. ovis*), tasemnice kočičí (*T. taeniaeformis*), měchožil zhoubný (*Echinococcus*

granulosus), měchožil bublinatý (*E. multiocularis*), motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), motolice obrovská (*Fascioloides magna*), motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*), motolice jelení (*Paramphistomum cervi*), krevničky (*Schistosoma* spp.) a mnoho dalších (Lamka a Ducháček, 2008).

Dříve se využívaly jako anthelmintika různé rostlinné extrakty. Z extraktu kapradě samce se získala látka proti tasemnicím – kyselina filicinová a z merlíku vonného se získal askaridol proti škrkavkám (Opletalová, 2006). Dnes už jsou k dispozici modernější metody terapie. Léčiva můžeme dělit podle spektra účinku na anticestodika (např. niklosamid, prazikvantel), antinematodika (např. benzimidazoly, piperazin, pyrantel, ivemektin, levamizol, pyranteliumembonát) a antitrematodika (např. prazikvantel, metrifonat, benzimidazoly, klosantel, klorsulon, nitroskanat, arekolin). Většina těchto léčiv ovlivňuje nervový systém červa, působí spastickou paralýzu nebo ochablost červů v důsledku GABA-ergního působení, některá brání buněčnému dělení inhibicí tvorby mikrotubulů, jiné zase brání příjmu glukózy a znemožňují energetický metabolismus skrze rozpojení oxidativní fosforylace (Fendrich, 2011).

Anthelmintika můžeme také rozdělit do osmi kategorií, primárně podle jejich chemické struktury, ale také podle mechanismu účinku. Tyto skupiny jsou: benzimidazoly, difenylsulfidy, imidazolthiazoly, hexahydroxypyraziny, makrocyklické laktony, salicylanilidy, tetrahydropyrimidiny a ostatní (Horvat et al., 2012).

Anthelmitika ve veterinární medicíně jsou velmi důležitá. Prospěch moderních antiparazitických technik pro zemědělství a lidstvo (z pohledu získávání zdravé a levné potravy) je enormní. Je odhadováno, že infekce zvířat parazity stojí americký trh s dobytkem ročně 2500 milionů dolarů (McKellar, 1997).

2.6.1. Benzimidazolová anthelmintika

Jako anthelmintika se velmi dobře osvědčily právě deriváty benzimidazolu. Vykazují nejširší anthelmintickou účinnost, mají helmitocidní účinky na vajíčka, larvy i dospělé. Mechanismus jejich účinku spočívá v blokování β -tubulinových subjednotek a to vede k zastavení buněčného dělení v metafázi. Také omezují přísun glukózy do buněk a snižují tak tvorbu glykogenu a ATP, což způsobí rozvrat energetického metabolismu helminta. Některé benzimidazoly jsou známé tím, že inhibují růst hub, což

ovlivňuje rychlost rozkladu hnoje na pastvinách (McKellar, 1997). Tato léčba je obvykle dobře snášena a má minimum nežádoucích účinků, nejvíce se objevuje nauzea, průjemy a zvracení. Z ekotoxikologického hlediska benzimidazolová anthelmintika teď poutají čím dál víc pozornost vědců kvůli své vysokoobjemové produkci a potenciálním nežádoucím účinkům na necílené organismy (Svendsen et al., 2005).

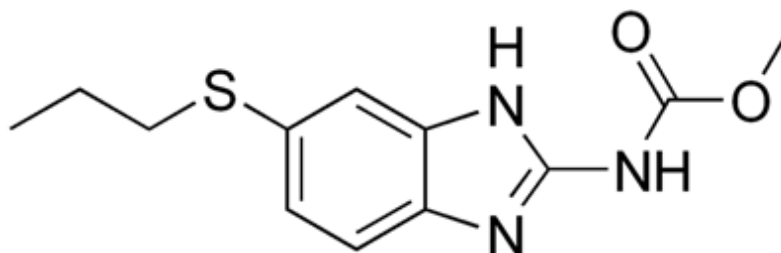
Prvním benzimidazolovým anthelmintikem byl tiabendazol, objevený v roce 1961, krátce poté byla vyvinuta celá řada dalších benzimidazolových širokospektrých anthelmintik. Existuje rozsáhlá literatura zabývající se těmito sloučeninami a referující o jejich četných biochemických účincích (Holden-Dye a Walker, 2007).

2.6.1.1. Albendazol

ABZ je širokospektré anthelmintikum, které jako jediné účinkuje proti všem vývojovým stádiím hlísta (tj. vajíčkům, larvám i dospělým červům). Pravděpodobný mechanismus účinku této látky se vysvětluje degenerací mikrotubulů střevních buněk. V konečném důsledku dochází ke snížení tvorby ATP s následným nedostatkem energie, čímž zabíjí jak dospělé hlísty, tak i jejich vývojová stádia. Používá se nejvíce při léčbě enterobiózy, askariózy, trichuriózy, trichinelózy, strongyloidózy a při terapii neurocysticercózy, kterou způsobuje larva *Taenia solium*. Látka se pouze málo vstřebává ze zažívacího traktu, její absorpce se ale zvyšuje při současném podání tučných jídel. Pokud se dostane do organismu, váže se ze 70% na bílkoviny krevní plasmy a dobře se v organismu distribuuje. Dostává se i do nitra cyst i do cerebrospinální tekutiny a je sekretována mlékem. ABZ se metabolizuje v játrech na aktivní metabolit albendazol-sulfoxid (ABZ-SO) a je vylučován žlučí. Jeho eliminační poločas je 8-12 hodin. ABZ je kontraindikován při hypersensitivitě na podobné sloučeniny, v těhotenství a u kojících žen. Ve veterině se používá u dobytka a ovcí. Opatrnosti je třeba u poškození sítnice. Nežádoucí účinky zahrnují bolest hlavy, závratě, meningeální příznaky a horečku. Může se vyskytnout reversibilní alopecie. Z gastrointestinálních nežádoucích účinků se popisuje nauzea, zvracení a abnormální jaterní testy. Řídké jsou hematologické poruchy jako např. leukopenie, pancytopenie a agranulocytóza (Fendrich, 2011).

ABZ a fenbendazol mají sulfanylovou funkční skupinu, která je náchylná k oxidaci. Metabolické studie ukázaly, že tyto látky sledují stejnou cestu v různých druzích savců. Jako produkt oxidace ABZ vzniká hlavní aktivní metabolit ABZ-SO,

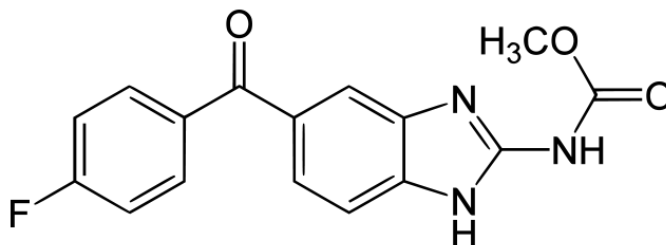
známý také jako rikobendazol. ABZ-SO má ve své struktuře asymetrické centrum a tak existují dva enantiomery ABZ-SO. Část sulfoxidu se dále mění další oxidací na albendazol-sulfon (ABZ-SO₂). Primární metabolit ABZ-SO má anthelmintickou aktivitu a účinnost ABZ se přisuzuje právě tomuto jeho metabolitu. ABZ-SO₂ není anthelminticky účinný (Horvat et al., 2012).



Obr. 5 Methyl-N- [5-(propylsulfanyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát, Mr 265,33

2.6.1.2. Flubendazol

Jedná se o syntetické anthelmintikum typu benzimidazol-karbamátů používané ve veterinární medicíně. FLU je široce využíváný v antiparazitické léčbě u prasat, kuřat, krůt, lovného ptactva a domácích šelem (Bártíková et al., 2009). Synonyma k názvu jsou třeba flubenol a frommex. FLU je nerozpustný v alkoholu, anorganických kyselinách a vodě. Je snadno rozpustný v organických kyselinách a organických rozpouštědlech. Teplota tání je 260 °C (CliniPharm). Hlavním mechanismem účinku je inhibice stavby mikrotubulů cestodů a nematodů. FLU je velmi málo rozpustný ve vodě a proto se velmi málo absorbuje ze střeva. V naprosté většině odchází z těla stolicí zcela nezměněn. Malá část je metabolizována v játrech hydrolýzou a redukcí s následnou konjugací a vyloučením žlučí a močí.



Obr. 6 Methyl-N-[5-(4-fluorbenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát, Mr 313,28

2.6.2. Rezistence u anthelmintik

V posledních letech dosáhl problém anthelmintické rezistence takových výšek, že už nemůže být nadále ignorován. V mnoha částech světa evidujeme vysoký výskyt multi-rezistentních parazitů a není nezvyklé, když najdeme ovčí nebo kozí farmy, kde je rezistence proti všem dostupným léčivům. Během posledních 10-15 let jsme svědky rapidního vzrůstu prevalence i rozsahu rezistence a tento trend se jeví jako celosvětový problém, který je potřeba řešit. Jak jsou uváděna na trh nová léčiva, je stále důležitější včasná a přesná diagnostika rezistence, jinak bude brzy chybět jakákoli účinná alternativa léčby (Kaplan a Vidyashankar, 2012).

Anthelmintická rezistence je celosvětově rozšířená u nematod parazitujících na ovcích, kozách a koních. Rezistence helmintů se také často vyvíjí u dobytka a byla objevena už i u prasat. Léková rezistence se nejpravděpodobněji vyvine tam, kde jsou anthelmintika používána velmi často a pravidelně (Prichard, 1994).

U hospodářských zvířat, kde se stala anthelmintika jediným prostředkem, se u některých druhů helmintů vyvinuly mechanismy, které jim pomáhají se účinkům anthelmintik bránit. Tím, že jsou z populace červů eliminováni citliví jedinci, zůstávají jen rezistentní jedinci a rezistentní populace začne dominovat. Tato selekce anthelminticky rezistentních populací je nejčastěji popisována u koňovitých a malých přežvýkavců, tedy u hostitelů, kde jsou anthelmintika používána nejčastěji (Craig, 1993). Čím častěji se helminti dostávají do kontaktu s anthelmintiky, tím pravděpodobnější je vývoj rezistence. Kontakt helmintů s anthelmintikem vede k zahubení většiny helmintů (senzitivních), avšak k přežití několika rezistentních parazitů, kterým je umožněno se rozmnožit a přispět tak svými geny k příští rezistentní generaci (Sangster, 1999).

Studie provedená na 46 ovčích a kozích farmách v USA z roku 2002 až 2006 eviduje rezistenci vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*) na benzimidazoly v 98%, levamizol v 54%, ivermektin v 76% a na moxidektin v 24% farem (Howell et al., 2008). Další studie na deseti stádech v Brazílii zkoušela účinnost albendazolu, klosantelu, doramektinu, fenbendazolu, ivermektinu, levamizolu, moxidektinu a nitroxynilu. Na dvou z deseti farem nebylo účinné žádné z anthelmintik a multi-rezistence byla společná všem stádům (da Cruz et al., 2010). Nedávné studie z Evropy

referují, že prevalence rezistence je zde nižší než v jiných oblastech světa (Kaplan a Vidyashankar, 2012).

Rezistence na benzimidazoly u nematod a hub je spojená s modifikací v genech, která snižuje nebo zcela ruší afinitu benzimidazolů k vazbě na tubulin v těchto organismech. Tento poznatek může být využit pro DNA sondy, které zjišťují citlivost na benzimidazoly u jedinců (Prichard, 1994). Za rezistenci na benzimidazoly může bodová mutace v genu pro β -tubulin izotyp 1 a postupná delece několika dalších izotypů. Tyto kroky se mohou objevit jen u několika málo generací a poskytnou potenciál pro rychlý rozvoj rezistence (Sangster, 1999). U jiných anthelmintik než u benzimidazolů neexistují molekulové markry k nalezení a změření anthelmintické rezistence. A ani pro benzimidazoly není mnoho dat přímo potvrzujících korelaci výskytu určité mutace s očekávanou účinností léčiva. Snížená anthelmintická účinnost a její fenotyp může být měřen s použitím testů účinnosti in vivo nebo biologických zkoušek senzitivity na léčivo in vitro (Kaplan a Vidyashankar, 2012).

Zkřížená rezistence je úkaz, kdy je parazit rezistentní na jedno léčivo z chemické třídy a zároveň i na další ze stejné skupiny. Dále je zde i důkaz sdružené rezistence (rezistence vzniká mezi různými chemickými skupinami léčiv) mezi imidazothiazoly a organofosfáty. Rezistentní parazité mají nízkou tendenci vrátit se k senzitivitě. Zpětná selekce při použití alternativní chemické látky umožní snížení frekvence rezistentních genů v populaci. Avšak rezistentní alely zůstávají stále v populaci (Sangster, 1999).

Rozvoj anthelmintické rezistence je nevyhnutelným důsledkem léčby anthelmintiky. Jedině racionálním přístupem založeným na důkazu k parazitické kontrole s cílem udržitelnosti může živočišná výroba zajistit, že anthelmintická léčiva zůstanou účinná (Kaplan a Vidyashankar, 2012).

3. Cíl práce

- Stanovení viability buněk rákosu obecného v přítomnosti anthelmintik.
- Identifikace metabolitů flubendazolu v rostlinných buňkách.
- Identifikace metabolitů albendazolu v rostlinných buňkách.
- Stanovení koncentrace hlavních metabolitů FLU a ABZ v živném médiu a v rostlinných buňkách.
- Sledování vlivu FLU na rostlinný proteom pomocí 2-D gelové elektroforézy.

4. Experimentální část

4.1. Materiál, pomůcky, přístroje

4.1.1. Chemikálie

2,4-dichlorodifenoxyoctová kyselina (2,4-D)

2-merkptoethanol

Aceton

Agar

Agaróza

Albendazol

Albendazol-sulfoxid

Barvivo Coomassie Brilliant blue G 250

Bradfordovo činidlo

Bromfenolová modř

CaCl₂

CaCl₂.6H₂O

CaCl₂.2H₂O

CaCl₂.6H₂O

CuSO₄.5H₂O

Destilovaná voda

DMSO (dimethylsulfoxid)

DTT (dithiothreitol)

EDTA (etylendiamintetraoctová kys.)

Ethanol

FeSO₄.7H₂O

Flubendazol

Glycerol

Glycin

H₃BO₃

HCl
CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diethylamonium]-1-propan-sulfonát)
Inositol
Jodacetamid
 KH_2PO_4
KI
Kinetin
 KNO_3
Koncentrovaný roztok amoniaku
Kyselina nikotinová
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Milli Q voda
Minerální olej
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Močovina
Myo-inositol
 Na_2EDTA
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
NaOH 1M
 NH_4NO_3
PMSF (fenylmetylsulfonylfluorid, inhibitor proteáz)
Pyridoxin
Quick start Bovine Serum Albumin Standard Set Biorad (0,124-2mg/ml)
Sacharóza
Savo Original
SDS (dodecylsulfát sodný)
Standard 2D-SDS-PAGE
Sørensenův fosfátový pufr pH 7,5
TCA (trichloroctová kyselina)
Tekutý dusík
Thiamin
TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan)
TTC (2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid)
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

4.1.2. Pomůcky a přístroje

Pomůcky:

Automatické pipety (SOCOREX Acura, Nichiryo Nichipet EX), špičky, kádinky, odměrné válce, Erlenmayerovy baňky, Büchnerova nálevka, plastové zkumavky s uzávěry, mikrozukavky Eppendorf, vialky, zásobní lahve, magnetická míchadla, nůžky, nálevky, pinzety, filtrační papír, alobal, parafilm, třecí miska s třerkou, kultivační krabičky se sítky, skleněné lahvičky, kopistky, stříčka, stojánky, elektroforetická vana, „stain-free“ gely (Criterion TGX, Bio-Rad), stripy (Bio-Rad, 11 cm, pH 3-10).

Přístroje:

Analytické váhy Analytical Standard AS 200 OHAUS
Analyzátor Gel Doc Ez Imager Bio-Rad
Autokláv H+P Labortechnik Steam sterilizer Varioklav 75 T
Box s laminárním prouděním Holten Laminair model 1.2
Centrifuga Biofuge Stratos Heraeus
Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5810 R
Centrifuga Hettich centrifuge univerzal 32 R
Denzitometr Bio-Rad GS 800
Fokusátor Protean IEF Cell Bio-Rad
Homogenizátor Potter S Homogenizer - B. Braun Biotech international
Incubátor Thermo Shaker TS-100 Biosan
Kývačka Labnet Revolver 360° Sample Mixer
Ledovač Ice-Maker HBZ-15
Lyofilizátor LABCONCO freezone 2,5
Magnetická míchačka IKA Color Squid Wildcat Stirrer
Odparka Eppendorf Concentrator 5301
pH Electrode Sentix 41 WTW
pH metr pH 3210 WTW
SDS-PAGE elektroforéza Power Pac 3000 Bio-Rad
Spektrofotometr TECAN Infinite M 200
Třepačka Edmund Bühler KS 15
Třepačka Heidolph Multi Reax
Třepačka IKA KS 260 basic

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 31

Ultrazvukový hrot Bandelin Sonopuls HD 2070

Vakuová odparka CentriVap Concentrator LABCONCO

Vortex Mikrospin FV 2400 Biosan

Vysokoučinná centrifuga Beckman Coulter Avanti J-30I

4.1.3. Biologický materiál

Suspenzní kultury rákosu obecného (*Phragmites australis*) – ÚEB AV ČR

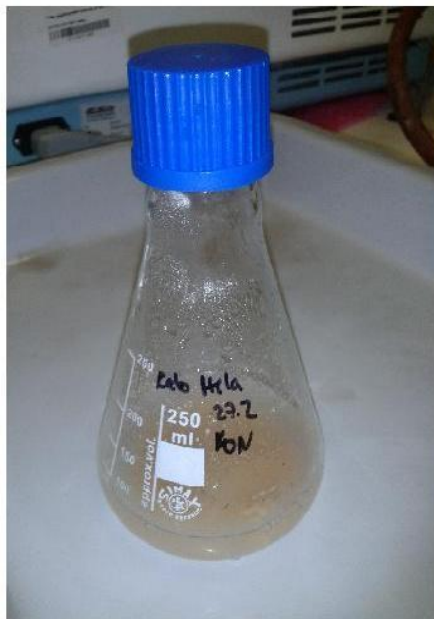
Semena huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) – ÚEB AV ČR

4.2. Metodika práce

4.2.1. Kultivace rostlin

4.2.1.1. Rákos

Suspenzní kultury byly kultivovány na rotační třepačce v erlenmayerových baňkách na médiu RH 2+K (viz Tab. 2) ve tmě při stálé teplotě 24 °C. Každých 10 dní byly suspenze pasážovány v laminárním boxu. Všechny použité baňky i média byla předem vysterilizována v parním autoklávu. Po nárůstu hustoty suspenzí bylo v boxu s laminárním prouděním do erlenmayerových baněk s plastovými uzávěry naváženo po 8-mi gramech buněk z každé baňky a k nim bylo přidáno 50 ml kultivačního média RH 2+K.



Obr. 7 Suspenze rákosu a filtrace buněk.

Tab. 2 Tekuté médium pro mokřadní rostliny - RH 2+K.

zásobní roztok (ZR)	složení	na 1l ZR	na 1l média	koncetrace v médiu
A	NH ₄ NO ₃	82,5 g	20 ml	1650 mg/l
B	KNO ₃	95 g	20 ml	1900mg/l
C	KH ₂ PO ₄	34 g	5 ml	170 mg/l
	H ₃ BO ₃	2 g		10 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50 mg		250 µg/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5 mg		25 µg/l
	MnSO ₄ .4H ₂ O	190 mg		950 µg/l
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	280 mg		1400 µg/l
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	88 g	5 ml	440 mg/l
E	MnSO ₄ .4H ₂ O	5 g	5 ml	25 mg/l
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 g		10 mg/l
	CuSO ₄ .5H ₂ O	5 mg		25 µg/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	74 g		370 mg/l
F	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,785 g	10 ml	27,85 mg/l
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,725 g		37,25 mg/l
		na 100 ml ZR		
VITAMÍNY	inositol	1,982 g	10 ml	99,1 mg/l
	thiamin	202 mg		10,118 mg/l
	kys.nikotinová	20 mg		985 µg/l
	pyridoxin	21 mg		1028 µg/l
2,4-D		10 mg	2,25 ml	0,225 mg/l
Kinetin		10 mg	2,22 ml	0,2175 mg/l
sacharóza			40 g	
pH			5,6	

4.2.1.2. Huseníček

Sterilizace semen.

Semena byla vložena do mikrozkušavky Eppendorf a k nim bylo přidáno 1 ml 70% ethanolu. Po 2-minutovém protřepávání byl ethanol odpipetován a přidán 10% roztok Sava (5% chlornan sodný). Po 10-minutovém protřepávání byl roztok Sava odpipetován a semena promyta třikrát sterilní vodou.

Výsev a přesazování rostlin.

V boxu s laminárním prouděním byla semena vyseta do sterilních skleniček s pevným živným médiem MS-ARAB (viz Tab. 3) po cca třech semenech na jednu skleničku. Po 14 dnech byly rostliny přesazeny do krabiček na sítko na tekuté médium MS-ARAB, po cca dvou týdnech byly rostliny i se sítky přesazeny do nových krabiček s 50 ml média. Všechny pomůcky a média musela být předem vysterilizována v autoklávu a práce probíhala v aseptickém prostředí laminárního boxu. Rostliny byly kultivovány v klimaboxu při konstantní teplotě 20°C s 16-ti hodinovým světelným režimem po dobu celkem 7-8 týdnů od vysetí do sklizně.



Obr. 8 Přesazování sítek s huseníčkem na nové médium.

Tab. 3 Složení kultivačního média pro huseníček – MS-ARAB.

zásobní roztok (ZR)	složení	na 1l ZR	na 1l média	koncentrace v médiu
A	NH ₄ NO ₃	82,5 g	20 ml	1650 mg/l
B	KNO ₃	95 g	20 ml	1900mg/l
C	KH ₂ PO ₄	34 g	5 ml	170 mg/l
	H ₃ BO ₃	1,24 g		6,2 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50 mg		250 µg/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5 mg		25 µg/l
	KI	166 mg		830 µg/l
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	88 g	5 ml	440 mg/l
E	MnSO ₄ .4H ₂ O	5 g	5 ml	25 mg/l
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 g		10 mg/l
	CuSO ₄ .5H ₂ O	5 mg		25 µg/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	74 g		370 mg/l
F	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,23 g	10 ml	22,3 mg/l
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7,45 g		74,5 mg/l
		na 100 ml ZR		
VITAMÍNY	myo-inositol	10 g	1 ml	100 mg/l
	thiamin	1 g		10 mg/l
	kys.nikotinová	0,1 g		100 µg/l
	pyridoxin	0,1 g		100 µg/l
agar *			8 g	*jen pro tuhá média
sacharóza			30 g	
pH			5,7-5,8	

4.2.2. Biotransformační studie ABZ a FLU v rostlinných buňkách

Rákos:

Do narostlé suspenze rákosu byl aplikován roztok FLU rozpuštěném v DMSO tak, aby finálně v baňce s buňkami vznikl jeho 10 μ M roztok.

313mg/1ml....1M

3,13mg/1ml....10mM

3,13 μ g/1ml....10 μ M

156 μ g/50ml....10 μ M...Potřebuji 156 μ g FLU na nastresování 1 suspenze.

FLU byl rozpuštěn v DMSO a aplikován v boxu s laminárním prouděním po 50 μ l tohoto roztoku do baněk. V intervalech 4, 8, 24, 48 a 96 hodin byly odebírány buňky i samotná média (2ml) s odfiltrovanými buňkami. 0,5g buněk z filtru bylo odebráno na test viability (pouze z prvního odběru). Zbytek buněk byl zlyofilizován na pozdější zjištění obsahových látek pomocí HPLC (ve všech časech odběrů). Pro každý časový interval byl odebrán vzorek ze tří baněk. Zároveň byly provedeny stejné odběry i z baněk se suspenzemi rákosu, kde nebyl FLU aplikován. Ty byly použity jako porovnávací kontroly (biologické slepé kontroly), do nich byl aplikováno pouze 50 μ l DMSO. Dále byly ve stejných intervalech odebírány vzorky z chemických slepých kontrol, které obsahovaly pouze čisté kultivační médium a anthelmintikum (FLU). Všechny vzorky byly před zpracováním na vlastní analýzu uchovávány v mrazicím boxu při -80°C.

Stejně bylo postupováno při stresování a sběru vzorků po aplikaci ABZ a ABZ-SO (ale nebylo již odebíráno půl gramu na test viability).

Huseníček:

Narostlé rostliny byly ovlivněny FLU rozpuštěným v DMSO (10 μ M koncentrace v médiu). Po třech dnech byly rostliny sklizeny, zamrazeny v tekutém dusíku a uloženy do mrazáku na -80°C. Stejně tak byly sklizeny i vzorky rostlin, které nebyly vystaveny působení FLU. Byly použity jako porovnávací kontroly. Tyto vzorky byly poté dále zpracovány podle postupu pro 2D-elektroforézu.

4.2.3. Test viability rostlinných buněk

Testování viability (živosti) buněk rákosu je založeno na redukcí 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu (TTC) na červený trifenylformazan živými buňkami (Chang, 1999). K 0,5 gramu buněk rákosu v plastové zkumavce s víčkem bylo přidáno 15 ml 0,8% roztoku TTC (viz Tab. 4) a uloženo do tmy a chladu. Po dvou hodinách byly buňky odstředěny a zality 15 ml etanolu. Po 24 hodinách byly buňky odfiltrovány a změřena intenzita zabarvení supernatantu na spektrofotometru při 485 nm. Analýza viability buněk byla provedena u několika nezávislých odběrů buněk v přítomnosti FLU a biologických slepých kontrol.

Tab. 4 Složení 0,8% roztoku TTC.

0,8% TTC		
TTC	4g	(C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄)
Sörensenův pufr pH 7,5	Doplnit na 500 ml	(Na ₂ HPO ₄ – 9,46g/l; KH ₂ PO ₄ – 4,52g/0,5l)

4.2.4. Příprava extraktů pro analýzu

4.2.4.1. Extrakce metabolitů z kultivačních médií:

Jednalo se o extrakci z kapaliny do kapaliny. Všechny vzorky se nejdříve nechaly rozmraznout, bylo z nich odebráno 300 µl do mikrozkuvek Eppendorf, k nim bylo přidáno 30 µl 25% roztoku amoniaku a 700 µl ethylacetátu. Vzorky byly promíchány a ponechány třepat 5 minut, potom byly vloženy do centrifugy na 3 minuty na 3 tis. otáček, 18°C. Horní fáze byla odebrána do nových zkumavek Eppendorf a odpařena ve vakuovém koncentratoru při 30°C dosucha.

4.2.4.2. Extrakce lyofilizovaných buněk rákosu:

K 50 mg rozmraženého lyofilizátu buněk bylo přidáno 2,5 ml destilované vody a vše se důkladně promícháno, poté byla směs zhomogenizována ultrazvukovým hrotem (30 sec.). Poté bylo přidáno 250 μ l NH_3 a 7,5 ml ethylacetátu a ponecháno třepat na třepačce 10 minut. Pak byly zkumavky odstředěny (10 minut) v Eppendorf Centrifuge 5810 R při 21°C na 1500 otáček. Horní čirá frakce byla opatrně automatickou pipetou přenesena po 1,5 ml do několika mikrozkušavek Eppendorf a supernatant byl odpařen ve vakuové odparce při 30°C dosucha. Vzorky byly před analýzou skladovány v mrazáku při -20°C.

Část vzorků z médií i suspenzí buněk nebylo extrahováno. Tyto vzorky byly přefiltrovány pomocí Millex-LG 0.20 μ m PTFE filtrů (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) a přímo nastříknuty do analytické kolony pro zjištění metabolitů.

4.2.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS)

Touto metodou byly identifikovány jednotlivé metabolity FLU a ABZ vzniklé biotransformací parentních látek buňkami rákosu. HPLC/MS analýzu provedl Mgr. Vokřál a já se na ní nepodílela, uvádím pouze stručný popis jejího provedení.

Před analýzou byly připravené extrakty rekonstituovány 100 μ l 10 % vodného roztoku acetonitrilu. Systém se skládal z pumpy Surveyor MS a Autosampleru Surveyor (oboje ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Poté byla provedena HPLC analýza (kolona: SymmetryShield RP18 2.1 \times 100 mm, 3.5 μ m (Waters, Milford, USA); mobilní fáze: A (0,1 % vodný roztok kys. mravenčí), B (0,1 % vodný roztok kys. mravenčí v acetonitrilu; gradient: 0.-10.min lineární gradient -10-60 % B, 10.-11.min od 60 po 80 % B, 11.-12,9.min 80 % B, 12,9.-13.min od 80 po 10 % B, 13.-25.min 10 % B; průtok 120 μ L/min; nástřik 10 μ l (extrakty médií)/20 μ l (extrakty buněk rákosu)). Následně byla použita detekce s LCQ Advantage spektrometrem s iontovou pastí (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) za těchto podmínek: ionizace elektrosperem, napětí: 5,3kV; teplota 200°C; průtok plynu 20.0 arbitrárních jednotek, průtok podpůrného plynu 10.0 arbitrárních jednotek, kolizní energie 40 %. Získání a

zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru Xcalibur (verze 1.2) a MetWorks (verze 1.3).

4.2.6. Kvantifikace obsahu hlavních metabolitů pomocí HPLC

HPLC analýzu provedl Ing. Kubíček. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny ve 150 μ l 10 % vodného roztoku acetonitrilu. Pro analýzu byl použit chromatograf Agilent Technologies 1200 SL, 1200 SL binární pumpa, 1200 SL plus autosampler, termostat kolony TCC Infinity 1290, detektor s diodovým polem 1200 SL a 1200 fluorescenční detektor, kolona: Ascentis® Express RP-Amide (100x3.0 mm; 2.7 μ m) a ochranná kolona Ascentis® Express C18 (5x3.0 mm; 2.7 μ m); izokratická mobilní fáze pro FLU: KH_2PO_4 pufr (0,025 mol/l, pH 3) a acetonitril (76:24), průtok 0,8 ml/min; izokratická mobilní fáze pro ABZ: Na_2HPO_4 pufr (0,015 mol/l, pH 7) a acetonitril (70:30), průtok 0,7 ml/min; teplota 25°C; nástřik 30 μ l. Při měření FLU diodovým detektorem byl pořízen záznam chromatogramů při 246nm s referencí při 390nm; při měření FLU-R fluorescenčním detektorem: excitace 286nm, emise 306nm; měření ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO₂ fluores. detektorem: excitace 290nm, emise 322nm. Analýza byla provedena v 8. a 10. minutě.

4.2.7. Dvourozměrná gelová elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza (2-DE) je klíčovou metodou používanou v proteomice, avšak je poměrně instrumentálně náročná. Tato technika spojuje dohromady isoelektrickou fokusaci (IEF), která dělí bílkoviny podle jejich isoelektrického bodu pI (protein se pohybuje v gradientu pH a zastaví se v místě, kde je celkový náboj molekuly nulový) a polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE), která dělí proteiny podle pohyblivosti, která závisí hlavně na molekulové hmotnosti. SDS dodá proteinu záporný náboj, který je úměrný jeho hmotnosti, což vede k frakcionaci molekul podle jejich průměrné velikosti. Zkombinují-li se tyto dva rozměry, vzniknou typické dvourozměrné proteinové mapy.

Extrakce proteinů:

Zmražené vzorky rostlin huseníčku byly uchovávány při -80°C , poté byly přeneseny do třecí misky a za přilévání tekutého dusíku rozetřeny na jemný prášek. Tento prášek byl přenesen do plastové flakonky a byl přidán roztok A (viz Tab. 5) vychlazený na -20°C v poměru 10 ml na 1g rostlinného materiálu. Poté byl vzorek pořádně protřepán a za občasného promíchání byl uložen do mrazáku na -20°C na 1 hodinu. Po hodině byly vzorky za chlazení na ledě rozpipetovány do mikrozkuavek Eppendorf po 1,8 ml a odstředěny ($15\text{min}/4^{\circ}\text{C}/14000\text{rpm}$). Supernatant byl vylit a byl přidán 1,8 ml roztoku B (viz Tab. 5) také vychlazeného na -20°C , vzorek byl promíchán a opět byl uložen na hodinu do -20°C za občasného promíchávání. Poté byla provedena centrifugace, byla odlita horní vrstva, znovu bylo připipetováno 1,8 ml roztoku B, promícháno, opět stočeno a byl odlit supernatant. Zbytek byl ponechán odpařit do prachové konzistence ve vakuové odparce po dobu 30 minut.

Tab. 5 Složení roztoků A a B.

Roztok A	
Aceton	20 ml
TCA	2 g
2-merkptoethanol	2 μl
Roztok B	
2-merkptoethanol	0,07 %
EDTA	2 mM
PMSF	1 mM

Solubilizace proteinů:

Ke vzorkům byl připipetován solubilizační pufr (viz Tab. 6) v poměru 50 μl na 1 mg proteinového prášku a vše bylo protřepáváno na třepačce při 37°C jednu hodinu, během této doby byly každých 10 minut vzorky promíchány. Po hodině byly stočeny na centrifuze ($15\text{min}/21^{\circ}\text{C}/14000\text{rpm}$). Byla odpipetována horní vrstva a znovu odstředěna až byl supernatant úplně čirý.

Tab. 6 Složení solubilizačního pufru.

Solubilizační pufr	(doplníme na 5 ml destil. vodou)
Močovina	2,7 ml
CHAPS	0,1 g
DTT	0,0463 g
Amfolyty	50 μ l

Měření koncentrace proteinů podle Bradfordové (Bradford, 1976):

Na mikrotitrační destičku bylo aplikováno do všech jamek 250 μ l Bradfordova činidla a k němu bylo přidáno 3krát 5 μ l pufru, vzorku s FLU, kontroly a sedm standardů hovězího sérového albuminu (koncentrace: 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2mg/ml) a byly ponechány 5 minut inkubovat. V důsledku tvorby komplexů barviva Coomassie Brilliant blue (CBB) s proteiny dochází ke změně barvy vzorků úměrně koncentraci proteinů ve vzorku. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm a koncentrace proteinů byla vypočtena z kalibrační křivky odvozené od absorbancí standardů hovězího sérového albuminu o známé koncentraci.

Isoelektrická fokusace:

Vzorek musí být před nanesením na strip zředěn solubilizačním puftrem, tak aby bylo ve 200 μ l vzorku 100 μ g proteinů. Do žlábků fokusační destičky bylo naneseno po 150 μ l vzorku. Stripy byly umístěny do vaničky gelem dolů a po 15 minutách byly převrstveny 1,5 ml minerálního oleje. Byla spuštěna aktivní rehydratace (50V, 20°C, 12 hod). Ráno byly stripy podloženy v místě styku s elektrodami filtračním papírem navlhčeným 8 μ l ultračisté vody a byla spuštěna fokusace.

Podmínky: kroky 1. odstranění nadbytečných solí, 200V, 30 min, 20°C

2. zvyšování napětí, 1500V, 3 hod, 20°C

3. zvyšování napětí, 5000V, 60000Vh, 20°C

4. udržovací krok, 500V, 15 hod, 20°C

Ekvibrace:

Po ukončení fokusace byly stripy nechány okapat, byly vloženy do plastových zkumavek s uzávěry a byl přidán ekvilibrační roztok 1 s DTT (zamezuje vzniku disulfidických vazeb) (viz Tab. 7) a byly 10 minut promývány na kývačce. Pak byly stripy přemístěny do roztoku 2 s jodacetamidem (alkyluje volné SH skupiny, nutné chránit před světlem) a byly ponechány 10 minut na kývačce.

Tab. 7 Složení ekvilibračních roztoků.

Ekvilibrační roztok 1 s DTT (doplněno vodou na HPLC na 8 ml)		Ekvilibrační roztok 2 s jodacetamidem (doplněno vodou na HPLC na 8 ml)	
Močovina	5,76 g	Močovina	5,57 g
Tris HCl pH 8,8	4 ml	Tris HCl pH 8,8	4 ml
SDS	0,32 g	SDS	0,32 g
Glycerol	3,2 ml	Glycerol	3,2 ml
DTT	0,16 g	Jodacetamid	0,2 g

SDS-PAGE:

Komerčně dostupné „stain-free“ gely byly vyjmuty z krabičky a opláchnuty elektroforetickým pufrům (viz Tab. 8), byly z nich sundány ochranné pásy a byly připraveny do stojánku. Pomocí filtračního papíru byl odsát přebytečný pufr. Stripy byly také opláchnuty v pufru a přeneseny na gely. Do levé horní komůrky bylo aplikováno 5 μ l standardu a vše bylo zalito roztavenou 0,8% agarózou s bromfenolovou modří a po vytlačení všech bublinek mezi stripem a gelem byla soustava ponechána 10 minut zatuhnout. Gely byly vloženy do elektroforetické vany a zality pufrům po značku. Byly zapojeny kabely dle náboje a byla spuštěna elektroforéza (200 V, 30 mA, 1 hod). Byl pozorován modrý pruh čela, po dokončení elektroforézy byly gely vyjmuty z plastových obalů a byly dány navlhčené a vyhlazené scanovat na desku pomocí Gel Doc EZ Imager a byly vyhodnoceny pomocí PDQest softwaru. Pak byly gely opatrně přeneseny do misek s roztokem barviva CBB a byly barveny asi 2 hodiny, pak byly gely odbarvovány v destilované vodě až odstín vyhovoval. Poté byly gely nascanovány pomocí Gel Doc EZ Imager a vyhodnoceny.

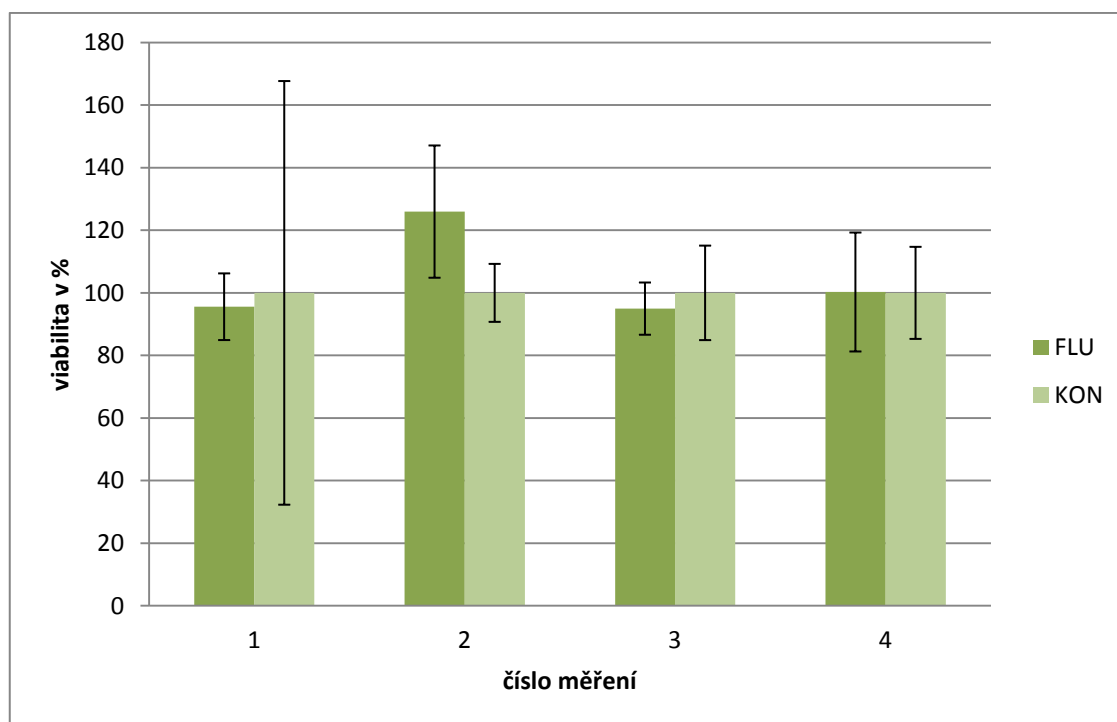
Tab. 8 Složení elektroforetického pufru.

Elektroforetický pufr (doplněn do 2 l vodou na HPLC)	
TRIS	6,057 g
Glycin	28,827 g
SDS	2 g

5. Výsledky

5.1. Vliv FLU na viabilitu buněk

Test viability buněk rákosu byl založen na redukcí TTC. Viabilita byla sledována u 4 nezávislých odběrů buněk ve stejných časech ovlivněných FLU a kontrol (KON) bez aplikovaného FLU. Byla změřena absorbance po 26 hodinách od odběru buněk. Procentuální vyjádření viability buněk exponovaných FLU bylo vztaženo k průměrným hodnotám absorbancí porovnávacích kontrol (přestavovaly 100%). Výsledky prokázaly, že viabilita buněk rákosu není signifikantně snížena expozicí s anthelmintikem - FLU.



Obr. 9 Viabilita buněk rákosu v přítomnosti FLU v porovnání s KON.

5.2. Biotransformace FLU v buněčné suspenzi

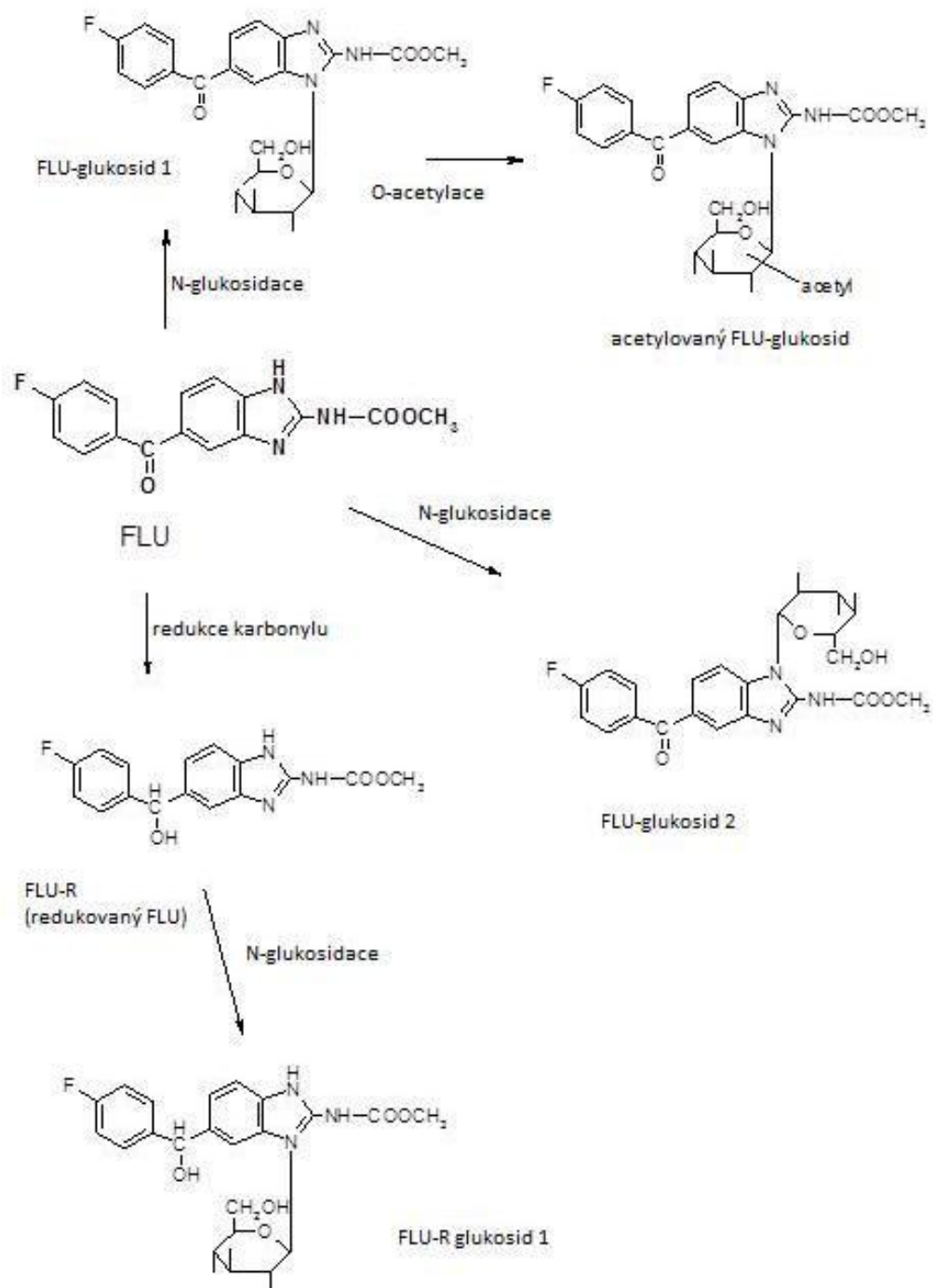
5.2.1. Identifikace metabolitů FLU

Hledali jsme metabolity v médiích i buňkách rákosu pomocí HPLC/MS. Bylo nalezeno 5 metabolitů FLU v buňkách. Hlavními metabolickými cestami byla redukce karbonylu, vedoucí ke vzniku redukovaného FLU (FLU-R) a N-glukosidace. FLU-R byl jediný metabolit fáze I metabolismu, ostatní čtyři pochází z fáze II. V médiu byly nalezeny jen 2 metabolity: FLU-R a FLU-glukosid 1. Na základě získaných výsledků byla sestavena možná schémata metabolické cesty FLU (obr. 11). V tabulce 9 jsou uspořádány všechny nalezené metabolity s jejich retenčním časem, vzorcem, molekulovou hmotností, popisem reakce, iontovým fragmentem i tím, kde byly nalezeny.

Tab. 9 Popis metabolitů FLU nalezených v médiu a buňkách rákosu po 8 a 24-hodinové inkubaci s FLU.

No.	t_R [min]	MW	Sumární vzorec metabolitu	Popis reakce		Fragment iontů, m/z	Metabolit	Detekován v:
				Fáze I	Fáze II			
1	11.04	315	$C_{16}H_{14}FN_3O_3$	redukce karbonylu		284	FLU-R	médium; buňky
2	11.59	477	$C_{22}H_{24}FN_3O_8$	redukce karbonylu	glukosidace	284, 316,	FLU-R-glukosid	buňky
3	12.58	475	$C_{22}H_{22}FN_3O_8$		glukosidace	282, 314	FLU-glukosid 1	médium; buňky
4	12.76	475	$C_{22}H_{22}FN_3O_8$		glukosidace	282, 314	FLU-glukosid 2	buňky
5	13.98	517	$C_{24}H_{24}FN_3O_9$		glukosidace + acetylace	282, 314, 486	FLU-acetylglukosid	buňky
6	14.78	313	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$			282	FLU (mateřská sloučenina)	médium; buňky

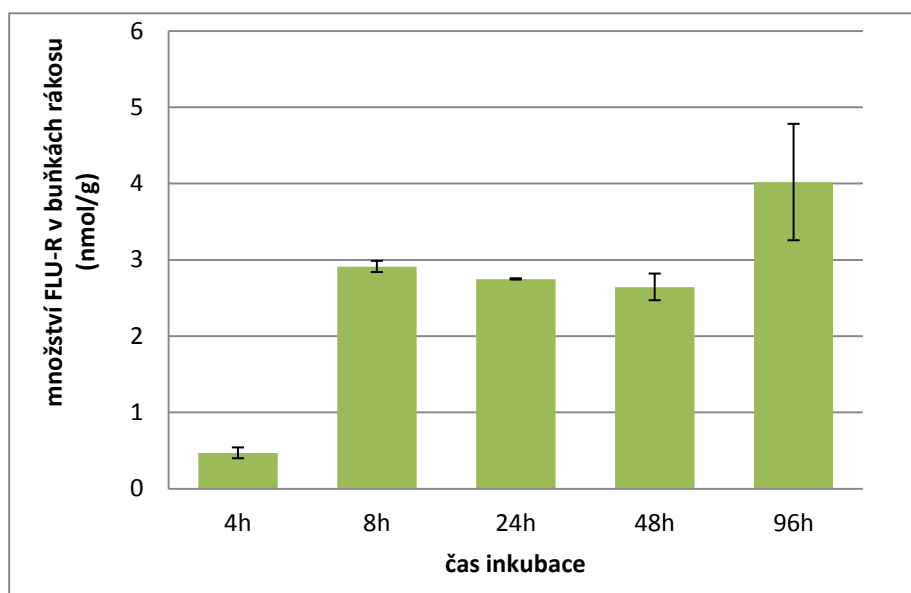
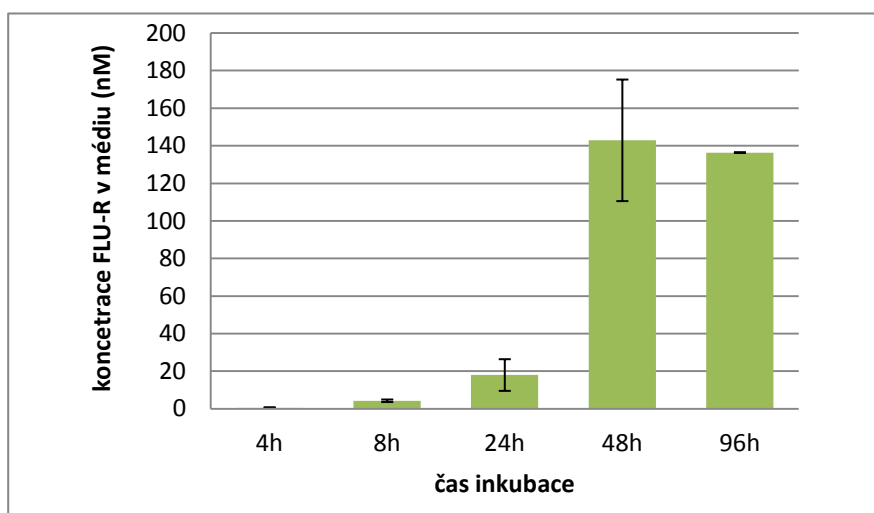
t_R retenční čas; MW molekulová hmotnost



Obr. 10 Schéma metabolismu FLU.

5.2.2. Stanovení koncentrace hlavního metabolitu FLU

Pomocí HPLC analýzy byla zjištěna koncentrace hlavního metabolitu FLU-R v médiu a buňkách suspenzí rákosu (Obr. 11). Tato hodnota byla přepočtena u médií na koncentraci FLU-R ve vzorku, a u buněk na látkové množství FLU-R vztažené na hmotnost sušiny buněk. Nejvyšší koncentrace FLU-R v médiu byla po 48-mi hodinách, zatímco v buňkách až po 96 hodinách.

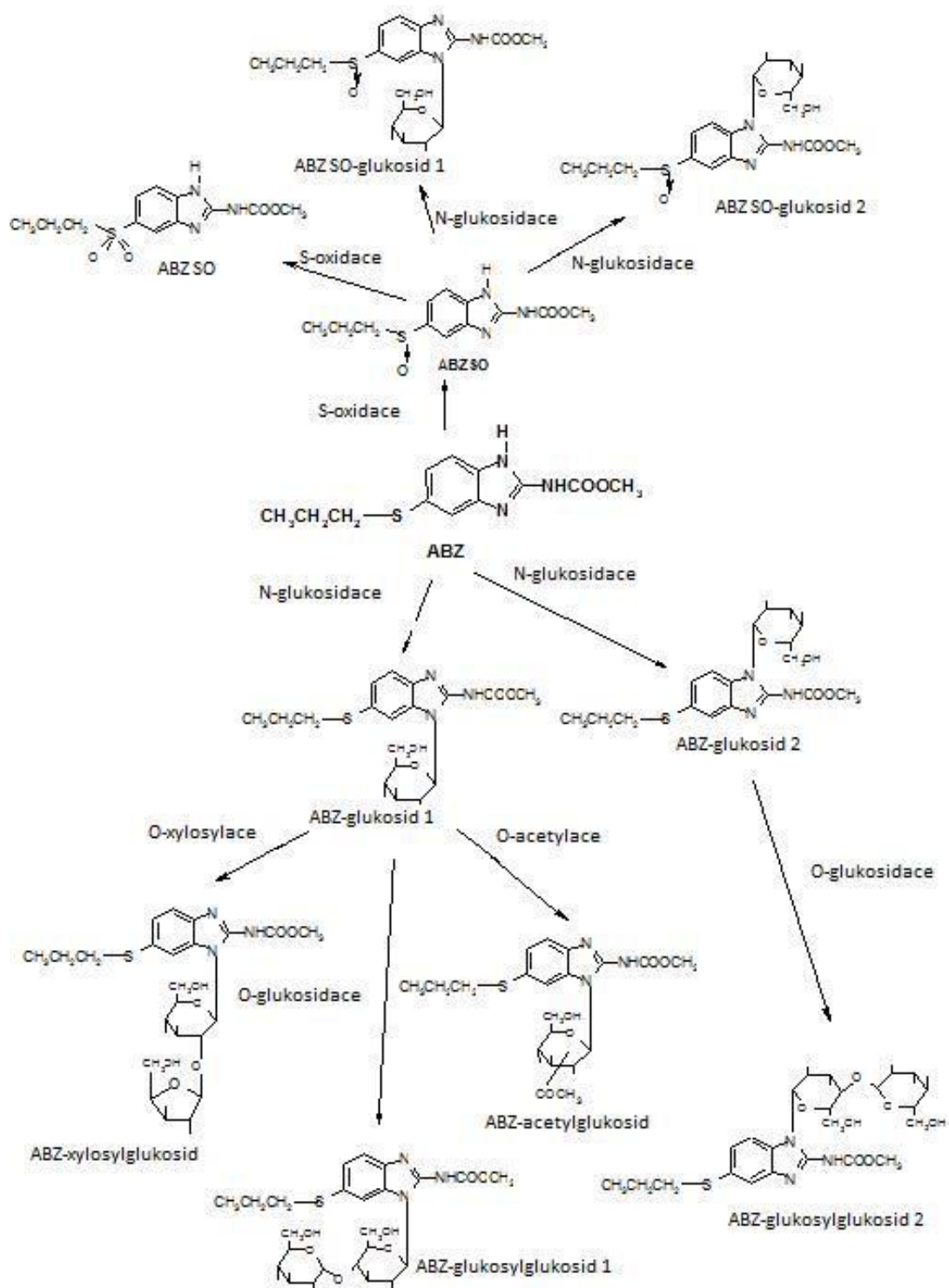


Obr. 11 Koncentrace FLU v médiu a buňkách rákosových suspenzí.

5.3. Biotransformace ABZ v buněčné suspenzi

5.3.1. Identifikace metabolitů ABZ

K identifikaci metabolitů ABZ tvořených v buňkách rákosu bylo použito HPLC/MS. Popis jednotlivých metabolitů (molekulová hmotnost, vzorec, popis reakce, klíčový iontový fragment, retenční čas, lokalizace) je uveden v tabulce 10. Dvoustupňová S-oxidace je jedinou reakcí fáze I biotransformace, vzniká tak hlavní metabolit ABZ-SO a ABZ-SO₂. Hlavní reakcí fáze II metabolismu je N-glukosidace, ale probíhá i O-glukosidace, acetylace a xylosylace (Obr. 12). Bylo nalezeno celkem 10 metabolitů ABZ, většina byla pouze v buňkách, ale 3 i v médiu.



Obr. 12 Schéma metabolismu ABZ.

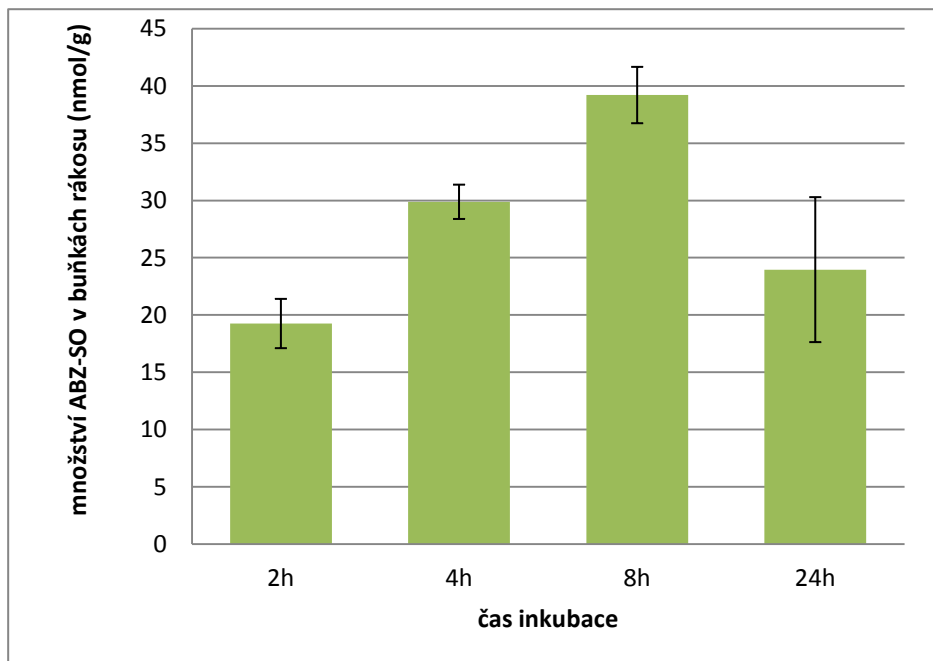
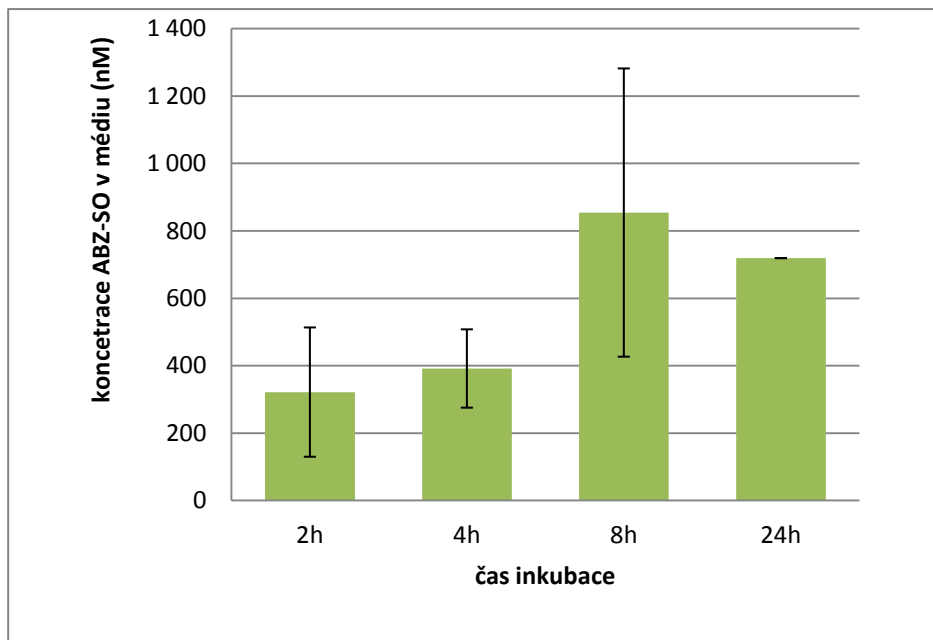
Tab. 10 Popis metabolitů ABZ nalezených v médiu a buňkách suspenzí rákosu po 8 a 24-hodinové inkubaci v přítomnosti ABZ.

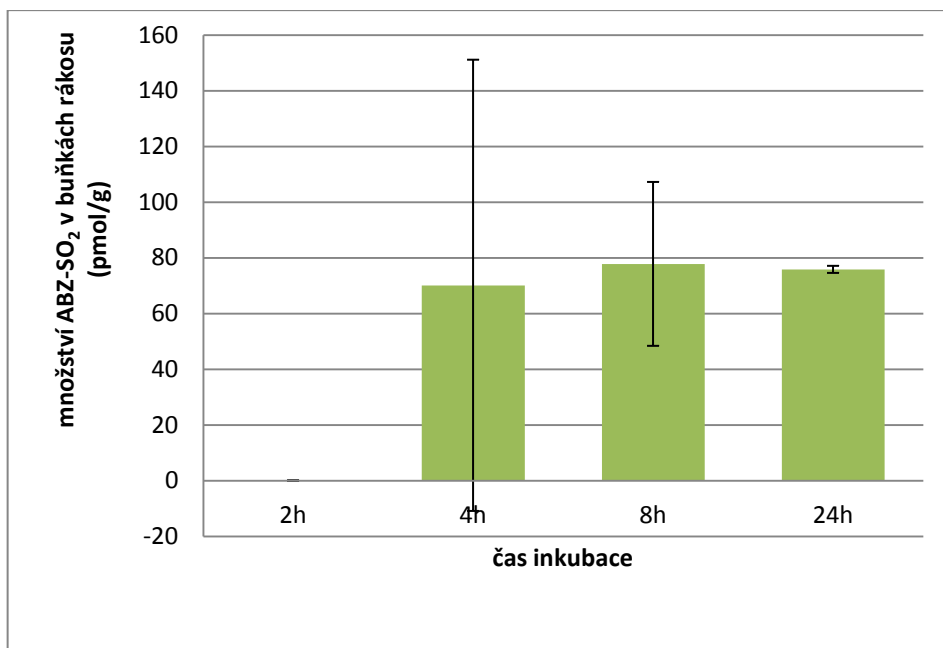
No.	t_R [min]	MW	Sumární vzorec metabolitu	Popis reakce		Fragment iontů, m/z	Metabolit	Detekován v:
				Fáze I	Fáze II			
1	9.00	443	$C_{18}H_{25}N_3O_8S$	S-oxidace	glukosidace	240, 282	ABZ-SO-glukosid 1	médium 24h, buňky 8h, 24h
2	9.74	443	$C_{18}H_{25}N_3O_8S$	S-oxidace	glukosidace	240, 282	ABZ-SO-glukosid 2	buňky 24h
3	10.35	282	$C_{12}H_{15}N_3O_5S$	S-oxidace		240	ABZ-SO	médium 24h, buňky 8h, 24h
4	10.90	589	$C_{24}H_{35}N_3O_{12}S$		2 x glukosidace	234, 266, 428, 558	ABZ-glukosylglukosid 1	buňky 24h
5	11.29	559	$C_{23}H_{33}N_3O_{11}S$		glukosidace + xylosylace	234, 266, 428, 528	ABZ-xylosylglukosid	buňky 24h
6	11.94	589	$C_{24}H_{35}N_3O_{12}S$		2x glukosidace	234, 266, 428, 558	ABZ-glukosylglukosid 2	buňky 24h
7	12.12	427	$C_{18}H_{25}N_3O_7S$		glukosidace	234, 266	ABZ-glukosid 1	médium 24h, buňky 8h, 24h
8	12.36	297	$C_{12}H_{15}N_3O_4S$	2 x S-oxidace		266	ABZ-SO ₂	buňky 8h, 24h
9	12.92	427	$C_{18}H_{25}N_3O_7S$		glukosidace	234, 266	ABZ-glukosid 2	buňky 24h
10	13.46	266	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$			234	ABZ (mateřská sloučenina)	médium 24h, buňky 8h, 24h
11	13.86	469	$C_{20}H_{27}N_3O_8S$		glukosidace + acetylce	234, 266, 438	ABZ-acetylglukosid	buňky 8h, 24h

t_R retenční čas; MW molekulová hmotnost

5.3.2. Stanovení koncentrace hlavních metabolitů ABZ

Pomocí HPLC byla zjištěna koncentrace metabolitu ABZ-SO v médiu a buňkách a ABZ-SO₂ pouze v buňkách suspenzních kultur rákosu v přítomnosti ABZ (Obr. 13). Nejvyšší koncentrace ABZ-SO v médiu i buňkách byla po 8 hodinách inkubace s ABZ.

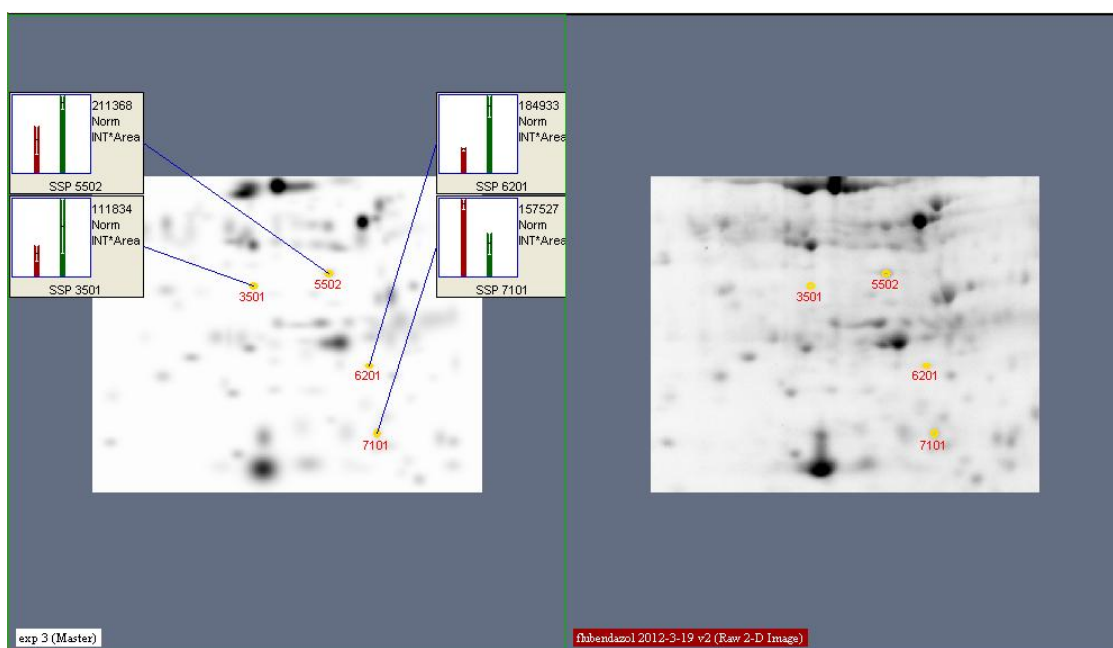




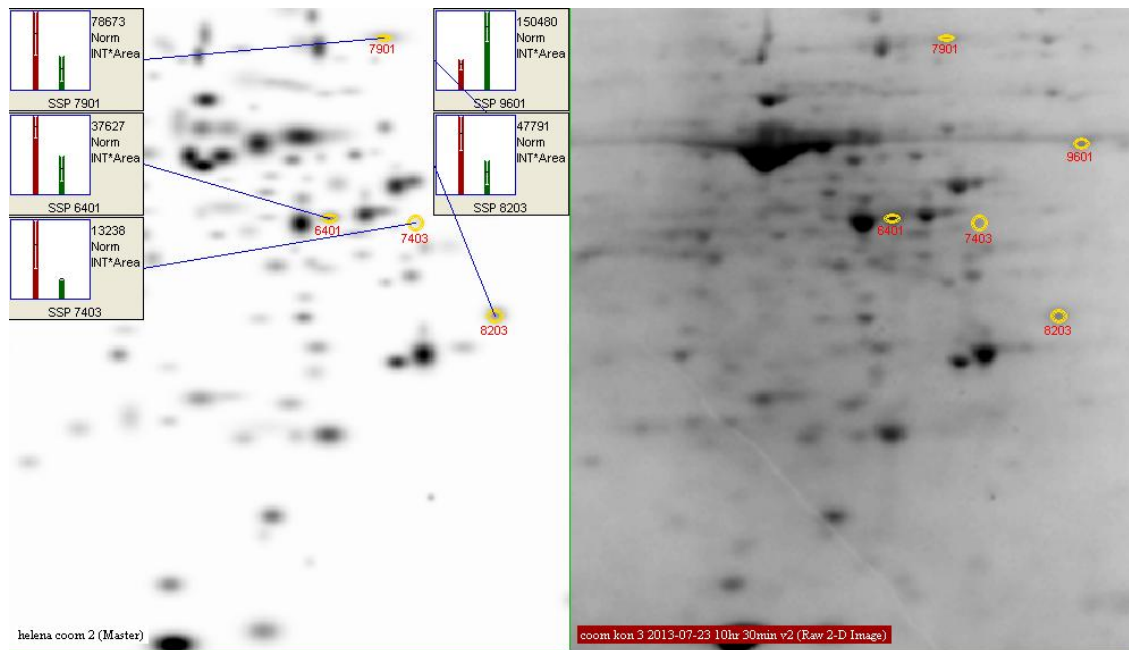
Obr. 13 Koncentrace ABZ-SO v médiu a buňkách rákosu a ABZ-SO₂ v buňkách rákosu.

5.4. Vliv FLU na rostlinný proteom

Změny v proteomu rostlin byly studovány pomocí dvojdimenzionální elektroforézy s využitím komerčně dostupných „stain-free“ gelů, k jejichž scanování je pracoviště (ÚEB AVČR, v.v.i.) vybaveno systémem Gel-Doc Imager (Bio-Rad). Výsledkem jsou složené proteinové mapy pro porovnávané skupiny (tzv. MASTER gel), kde jsou zobrazeny spoty reprezentující jednotlivé proteiny, jejichž intenzita je prokazatelně (minimálně dvojnásobně) změněná oproti kontrole. Na každém obrázku je jak Master gel (softwarem vytvořená mapa vzniklá složením všech porovnávaných gelů), tak scan jednoho ze skutečných gelů. Každou skupinu reprezentovalo 3-5 gelů (Obr. 14, 15).



Obr. 14 Změny v proteomu *Arabidopsis thaliana* v důsledku aplikace FLU (10 μ M): Na „stain-free“ gelech se projevila statisticky významná odlišnost u 4 proteinů, z toho 3 proteiny byly přítomny v nižším množství a 1 ve zvýšeném množství oproti nestresované kontrole (SSP7101).



Obr. 15 Změny v proteomu *Arabidopsis thaliana* v důsledku aplikace FLU (10 μ M). Na gelech barvených CBB se projevila statisticky významná odlišnost oproti nestresované kontrole u 5 proteinů, z toho 4 proteiny byly přítomny v nižším množství a 1 ve větším množství (SSP9601).

6. Diskuze

Cílem této práce bylo studovat možné využití fytořediačních postupů při detoxikaci anthelmintik ze životního prostředí. Dílčími úkoly bylo ověřit viabilitu buněk rákosu obecného v přítomnosti FLU a zjistit, zda jsou anthelmintika schopna prostupovat přes buněčnou membránu a jaké metabolity FLU a ABZ ve svých buňkách vytváří rákos. Dále jsem zjišťovala ovlivnění exprese proteinů v přítomnosti FLU u huseníčku rolního.

Existuje velká šíře uměle vyrobených i přírodních xenobiotik, jako jsou léky, průmyslové chemikálie, pesticidy, produkty pyrolýzy z vařeného jídla, sekundární metabolity rostlin, toxiny z bakterií, plísní, rostlin a zvířat. Tyto všechny látky mohou negativně ovlivňovat vitální funkce organismů a představují vážné riziko pro jejich homeostázu, integritu a zdraví. Léčiva jsou široce využívanými xenobiotiky. Pro jejich sledování je třeba nalézt vhodné bioanalytické metody (Holčapek et al., 2008). Právě hojně používaná anthelmintika, která jsou předmětem mé práce, by mohla být dobře odbouratelná z prostředí pomocí fytořediačních technologií. Co se týká veterinárních léčiv, bylo vedeno jen několik studií o jejich odstraňování rostlinami z životního prostředí. Tyto studie sice prokázaly vstup a akumulaci veterinárních léčiv v rostlinách, ale zatím chyběly informace o dalším osudu léčiva. Pro posouzení vhodnosti fytořediace je důležité zjistit nejenom, zda rostlina xenobiotikum přijímá a váže, ale také jakým způsobem ho metabolizuje ve svých buňkách. Pokud tato informace chybí, je tu riziko, že léčivo zůstává v rostlinách biologicky aktivní a může ohrožovat živočichy, kteří se rostlinami živí.

V této práci byly studovány metabolické schopnosti buněk rákosu obecného. Rákos byl vybrán, kvůli svému častému použití v UM. Tyto méně invazivní metody čištění prostředí, jako je fytořediace, jsou vhodné jen pro polutanty, které se vyskytují ve velmi nízké koncentraci. Rákos je často studován pro své fytořediační schopnosti různých organických polutantů (Gersberg et al., 1986; Tian et al., 2009; Šantrůčková et al., 2001; Peruzzia et al., 2009; Vymazal et al., 2009). Huseníček rolní je zase často používaným modelem pro proteomické studie (Wienkoop et al., 2010) a proto se jevil pro mou práci jako nejvhodnější.

Biotransformační studie byla navržena tak, aby zjistila hlavní metabolity dvou hlavních benzimidazolových anthelmintik – ABZ, FLU u rákosu. ABZ a FLU byl

zvolen, protože se často používá ve veterinární medicíně a byla detekována jejich přítomnost v odpadních vodách a zjištěny škodlivé účinky na některé bezobratlé živočichy (Oh et al., 2006).

Suspenzní kultury rákosu jsme použili jako *in vitro* modelový systém pro analýzu metabolitů s použitím vysoce citlivé HPLC s ionizací elektrosprejem s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Detekované metabolity byly identifikovány na základě přítomnosti protonovaných molekul $[M+H]^+$ a interpretovány podle iontového spektra, které produkovaly. Rychlý technický pokrok v hmotnostní spektrometrii přispěl ke zcitlivění, zvýšení rozlišení, větší přesnosti, novým typům analyzátorů a ionizačních technik (Holčapek et al., 2008). Tato technika umožňuje určení molekulové hmotnosti neznámé látky, vzniká přitom ale velké množství fragmentů, co znesnadňují odvození struktury. Tento problém lze vyřešit použitím spojení tandemové hmotnostní spektrometrie s HPLC (HPLC/MS/MS) (Holčapek a Jandera, 1998).

Touto metodou byly identifikovány metabolity, které se nacházely uvnitř buněk rákosu i v kultivačním médiu. Hlavním metabolitem FLU je u rákosu FLU-R, u ABZ to jsou ABZ-SO a ABZ-SO₂. Byly nalezeny i další metabolity a určily se reakce, kterými vznikají. Obecně fáze I biotransformace zahrnuje oxidaci, redukci, hydrolýzu a další méně častě reakce (např. chirální inverze). Oxidace, redukce a hydrolýza zavádí reaktivní funkční skupinu (-OH, -SH, -NH₂, -NH-, -COOH) do mateřské molekuly. Většina reakcí fáze II biotransformace xenobiotik vede k mnohem hydrofilnějšímu produktu, díky čemuž klesá jeho toxicita a snáze se vyloučí z těla (Holčapek et al., 2008).

Bylo nalezeno 10 metabolitů ABZ v buňkách a 3 v médiu rákosu. Nejdůležitějšími reakcemi biotransformace je S-oxidace a N-glukosidace. ABZ se ve fázi I oxiduje na aktivní ABZ-SO, z něj část podstoupí druhou oxidaci a vzniká ABZ-SO₂. Ve fázi II vznikají konjugáty ABZ a ABZ-SO s UDP-glukosou pomocí N-glukosidace, která je považována za cestu detoxikace. Tyto glukosidy další metabolizací tvoří několik atypických metabolitů. Následnou O-glukosidací vznikají dva ABZ-glukosylglukosidy, jeden ABZ-glukosid podstupuje další konjugaci s aktivovanou pentózou, UDP-xylosou, tvoří se tak ABZ-xylosylglukosid. Dalším minoritním metabolitem je ABZ-acetylglukosid, který vzniká O-acetylací z ABZ-glukosidu. Podle dostupných zdrojů, tyto typy metabolitů xenobiotik zatím nebyly popsány. Tyto druhy reakcí však nejsou u rostlin nijak překvapivé, protože je dobře známe ze způsobů tvorby

některých endogenních sloučenin rostlin, např. flavonoidů (Kachlicki et al., 2005; Sriseadka et al., 2012).

Většina metabolitů ABZ je k nalezení v buňkách rákosu, ale tři byly detekovány i v médiu: ABZ-SO, ABZ-SO-glukosid 1, ABZ-glukosid 1. Tento jev značí, že jsou tyto metabolity schopny určitého přesunu přes plazmatickou membránu a buněčnou stěnu.

Pro analýzu příjmu a biotransformace byly časy inkubace pro FLU prodlouženy, protože jeho metabolismus probíhá pomaleji v porovnání s ABZ. Detekce proběhla podobně jako u ABZ. Ve fázi I biotransformace vzniká pouze jeden metabolit FLU-R. Ve fázi II se tvoří N-glukosidací jeden FLU-R-glukosid a dva různé FLU-glukosidy. O-acetylací se tvoří ještě FLU-acetylglukosid. Pouze dva metabolity jsme našli i v médiu: FLU-R a jeden FLU-glukosid. V porovnání s ABZ je metabolismus FLU méně rozsáhlý. Bylo nalezeno jen 5 metabolitů FLU. Redukce karbonylu a N-glukosidace byly dvěma hlavními metabolickými reakcemi. Na rozdíl od ABZ, všechny biotransformační reakce sledované u FLU vedly k deaktivaci původního mateřského léčiva. FLU-R je mnohem méně toxický pro helminty než FLU (Bártíková et al. 2010) a konjugace glukózou je obecně považována jako deaktivující reakci. Vzniká také jeden atypický metabolit, FLU-acetylglukosid. Identifikace acetylglukosidů u obou strukturně rozdílných testovaných léčiv může naznačovat, že O-acetylace glukosidů xenobiotik může být relativně častá v rostlinných buňkách.

S cílem poznat více o efektivitě biotransformace benzimidazolů v buňkách rákosu, byly měřeny také množství hlavních metabolitů ABZ-SO, ABZ-SO₂ a FLU-R. Ostatní metabolity nemohly být kvantifikovány, protože nebyl dostupný odpovídající analytický standart.

Koncentrace ABZ-SO a ABZ-SO₂ byla měřena z buněk rákosových suspenzí a z médií inkubovaných 2, 4, 8 a 24 hodin. Množství v buňkách bylo vztaženo na hmotnost buněk lyofilizátu, v médiu bylo množství vyjádřeno jako koncentrace dané sloučeniny. V buňkách byla sledována intenzivní tvorba ABZ-SO. Množství ABZ-SO se zvyšovalo až do 8. hodiny, po 24 hodinách inkubace se množství ABZ-SO snížilo, pravděpodobně kvůli následné biotransformaci. Vysoká koncentrace ABZ-SO byla změřena i v kultivačním médiu, což indikuje možnou difuzi z buněk do média. V médiu probíhala i neenzymatická oxidace ABZ, množství ABZ-SO ve slepých vzorcích bez buněk byla odečtena od množství ABZ-SO vytvořeného ve vzorcích s buňkami rákosu. Další S-oxidace ABZ-SO je už pomalejší, pouze setina je přeměněna na ABZ-SO₂. Nebyly nalezeny žádné stopy po ABZ-SO₂ v médiu, pravděpodobně neprostupuje přes

membránu a buněčnou stěnu. Kvantifikace prokázala intenzivní a rychlou S-oxidaci, kterou z ABZ vzniká anthelminticky aktivní ABZ-SO, který je pouze částečně inaktivován na ABZ-SO₂ a ABZ-glukosidy.

Koncentrace hlavního metabolitu FLU sledovaná v buňkách rákosu narůstala mnohem pomaleji než u ABZ. Po 2 a 4 hodinách inkubace byly nalezeny pouze stopy FLU-R. Kvůli tomu byla inkubace buněk prodloužena a odběry se prováděly po 4, 8, 24, 48 a 96 hodinách. Množství FLU-R bylo zhruba desetkrát nižší než ABZ-SO. Část FLU-R přestupuje buněčnou stěnu a bylo nalezeno i v kultivačním médiu. Neprobíhá neenzymatická redukce FLU, protože nebyly nalezeny žádné stopy FLU-R ve slepých vzorcích. Všechny metabolity FLU vznikající v rákosu mohou být považovány za neaktivní.

Ačkoli jsou některé metabolity ABZ a FLU transportovány z buněk do média, hlavním předpokládaným úložištěm stále zůstává tělo rostliny rákosu a jeho buňky. Na toto uložení neaktivních a stálých metabolitů ABZ a FLU v rostlinách může být pohlíženo jako na výhodnou cestu dekontaminace prostředí od anthelmintik. Navíc příjem a uchování původního anthelmintického léčiva v rostlinách může snižovat toxicitu léčiv pro ekosystém tím, že se sníží jejich koncentrace v půdě a vodě.

Test viability buněk rákosu v přítomnosti FLU prokázal, že je rákos vhodným potenciálním nástrojem fytoremediace, protože životaschopnost jeho buněk v prostředí tohoto léčiva zůstala nenarušena. Zjistili jsme tak, že rákos vystavený koncentraci 10 μ M FLU bude pravděpodobně přežívat a tak se umožní jeho působení a rozklad polutantů v UM. Rákos se jeví jako dostatečně odolný pro použití ve fytoremediaci.

V rámci diplomové práce byla také optimalizována metoda pro extrakci proteinové frakce z rostliny *Arabidopsis thaliana* a následné studium změn proteomu vlivem anthelmintik. Pro testování různých metodických postupů byla použita klasická 2-D elektroforéza. Sledované rostliny byly stresovány přidáním FLU do kultivačního média (10 μ M).

S využitím dvojdimenzionální elektroforézy a následného softwarového vyhodnocení gelových obrazů byly po 3-denní *in vitro* kultivaci na médiu obohaceném FLU nalezeny změny v proteomu rostliny *Arabidopsis thaliana*. Jako kontrolní skupiny sloužily rostliny neovlivněné žádnou přidanou sloučeninou. Dle výsledku analýzy proteinových map získaných z gelů s různým způsobem vizualizace, došlo po aplikaci léčiva v porovnání s kontrolní skupinou ke zvýšení nebo snížení množství několika proteinů. Z výsledků je patrné, že jsou velmi ovlivněné způsobem barvení, přičemž

barvení CBB bylo (navzdory proklamacím výrobce) citlivější. Přítomnost FLU v médiu u všech pokusných rostlin vyvolala metabolickou odezvu. Zatím však není známo, které proteiny byly přítomností FLU ovlivněny. Identifikace jednotlivých proteinů bude naplní další studie.

7. Závěr

- Viabilita buněk rákosu nebyla výrazně ovlivněna přítomností anthelmintika (FLU).
- Bylo nalezeno 5 metabolitů FLU v rostlinných buňkách rákosu a 2 v médiu.
- Bylo nalezeno 10 metabolitů ABZ v rostlinných buňkách rákosu a 3 v médiu.
- Podařilo se stanovit koncentrace hlavních metabolitů FLU-R, ABZ-SO, ABZ-SO₂ v živném médiu a v rostlinných buňkách.
- FLU indukuje změny v proteomu *Arabidopsis thaliana*. Působením FLU došlo ke snížení množství 3-4 proteinů a zvýšení množství 1 proteinu oproti kontrole.

8. Použité zdroje

1. Alkorta, I.; Garbisu, C.. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* 79, 2001, 273-276.
2. Arabidopsis. [cit. 21.6.2013]. Dostupné z: <http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>.
3. Bártíková, H.; Křížová, V.; Lamka, J.; Kubíček, V.; Skálová, L.; Szotáková, B. Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 33, 2009, 56-62.
4. Bártíková, H.; Skálová, L.; Lamka, J.; Szotáková, B.; Várady, M. The effects of flubendazole and its metabolites on the larval development of *Haemonchus contortus* (Nematode: Trichostrongylidae), an *in vitro* study. *Helmintologia* 47, 2010, 269-272.
5. Batty, L.C.; Younger, P.L. Growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel in mine water treatment wetlands: effects of metal and nutrient uptake. *Environmental Pollution* 132, 2004, 85-93.
6. Bonanno, G.; Giudice, R. Lo. Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecological Indicators* 10, 2010, 639–645.
7. Botanika.Wendys. *Phragmites australis*. [cit. 21.6.2013]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K4092.php>.
8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72, 1976, 248-254.
9. Calheiros, C.S.C.; Rangel, A.O.S.S.; Castro, P.M.L.. Treatment of industrial wastewater with two-stage constructed wetlands planted with *Typha latifolia* and *Phragmites australis*. *Bioresource Technology* 100, 2009, 3205–3213.
10. Chang, W.Ch.; Chen, M.H.; Lee, T.M. 2,3,5-Triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40, 1999, 207-212.
11. CliniPharm. [cit. 24.6.2013]. Dostupné z: http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00003143/0156__F.htm.

12. Craig, T.M. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 46, Special Issue: Ostertagia, 1993, 121–131,.
13. Čelakovský, L. *Analytická květena Čech, Moravy a Rak. Slezska*. 3.vydání Praha: Unie, 1896.
14. da Cruz, D.G.; da Rocha, L.O.; Arruda, S.S.; Palieraqui, J.G.B.; Cordeiro, R.C.; Santos Junior, E.; Molento, M.B.; de Paula Santos, O.C. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology* 170, 2010, 340–343.
15. Derksen, J.G.F.; Rijs, G.B.J.; Jongebloed, R.H. Diffuse pollution of surface water by pharmaceutical products. *Water Science and Technology* 49, 3, 2004, 213-221, IWA Publishing.
16. Fendrich, Z. Přednáška farmakologie – Anthelmintika, FAF UK v Hradci Králové 2011.
17. Gerhardt, K.E.; Huang, X.-D.; Glick, B.R.; Greenberg, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176, 2009, 20–30.
18. Gersberg, R.M.; Elkins, B.V.; Lyon, S.R.; Goldman, C.R. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands. *Water Research* 20, 3, 1986, 363-368.
19. Hernando, M.D.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A.R.; Barceló, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in waste water effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 2006, 334-342.
20. Holčápek, M.; Kolářová, L.; Nobilis, M. High-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2008, 59–78.
21. Holden-Dye, L.; Walker, R.J. Anthelmintic drugs. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, 2.11.2007. [cit. 11.6.2013]. Dostupné z: http://www.wormbook.org/chapters/www_anthelminticdrugs/anthelminticdrugs.html

22. Horvat, A.J.M.; Petrović, M.; Babić, S.; Pavlović, D.M.; Asperger, D.; Pelko, S.; Mance, A.D.; Kaštelan-Macan, M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 31, 2012, 61-84.
23. Hoskovec, L. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – huseníček rolní / arábkovka Thalova. 2.7.2007, [cit. 21.6.2013]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/arabidopsis-thaliana/>.
24. Howell, S.B.; Burke, J.M.; Miller, J.E.; Terrill, T.H.; Valencia, E.; Williams, M.J.; Williamson, L.H.; Zajac, A.M.; Kaplan, R.M. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 233, 2008, 1 913–1919.
25. Hsu, Ch.-B.; Hsieh, H.-L.; Yang, L.; Wu, S.-H.; Chang, J.-S.; Hsiao, S.-Ch.; Su, H.-Ch.; Yeh, Ch.-H.; Ho, Y.-S.; Lin, H.-J. Biodiversity of constructed wetlands for wastewater treatment. *Ecological Engineering* 37, 2011, 1533– 1545.
26. Chen, T.Y.; Kao, C.M.; Yeh, T.Y.; Chien, H.Y.; Chao, A.C. Application of a constructed wetland for industrial wastewater treatment: A pilot-scale study. *Chemosphere* 64, 2006, 497–502.
27. InvasivePlants. [cit. 21.6.2013]. Dostupné z: <http://www.invasiveplants.net/phragmites/>.
28. Jjemba, P.K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 2006, 113–130.
29. Kachlicki, P.; Marczak, L.; Kerhoas, L.; Einhorn, J.; Stobiecki, M. Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. *J. Mass Spectrom.* 40, 2005, 1088-1103.
30. Kaplan, R.M.; Vidyashankar, A.N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 186, 2012, 70– 78.
31. Kar, S.; Roy, K. First report on interspecies quantitative correlation of ecotoxicity of pharmaceuticals. *Chemosphere* 81, 2010, 738–747.
32. Kivaisi, A.K. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecological Engineering* 16, 2001, 545–560.
33. Kotyza, J.; Soudek, P.; Kafka, Z.; Vaněk, T. Léčiva – „Nový“ environmentální polutant, *Chem. Listy* 103, 2009, 540-547.

34. Kröpfelová, L.; Vymazal, J.; Švehla, J.; Štíchová, J. Removal of trace elements in three horizontal sub-surface flow constructed wetlands in the Czech Republic. *Environmental Pollution* 157, 2009, 1186–1194.
35. Kümmerer, K. Drugs in environment: emission of drugs, diagnostics aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review. *Chemosphere* 45, 2001, 957-969.
36. Lamka, J.; Ducháček, L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*, 3. vydání Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1243-0.
37. Lee, B.-H.; Scholz, M. What is the role of *Phragmites australis* in experimental constructed wetland filters treating urban runoff? *Ecological engineering* 29, 2007, 87–95.
38. Liu, L.; Liu, Y.-H.; Liu, Ch.-X.; Wang, Z.; Dong, J.; Zhu, G.-F.; Huang, X. Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions. *Ecological Engineering* 53, 2013, 138– 143.
39. Macek, T.; Macková, M.; Káš, J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18, 2000, 23– 34.
40. McKellar, Q.A. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology* 72, 1997, 413-435.
41. Meagher, R.B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 2000, 153-162.
42. Morley, N.J. Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. *Environmental toxicology and Pharmacology* 27, 2009, 161-175.
43. Muñoz, P.; Drizo, A.; Hession, W. C. Flow patterns of dairy wastewater constructed wetlands in a cold climate. *Water research* 40, 2006, 3209 – 3218.
44. Nedunuri, K.V.; Govindaraju, R.S.; Banks, M.K.; Schwab, A.P.; Chen, Z. Evaluation of phytoremediation for field-scale degradation of total petroleum hydrocarbons. *Journal of Environmental Engineering* 126, 2000, 483–490.
45. Oh, S.J.; Park, J.; Lee, M.J.; Park, S.Y.; Lee, J.H.; Choi, K. Ecological hazard assessment of major veterinary benzimidazoles: acute and chronic toxicities to aquatic microbes and invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 8, 2006, 2221-2226.

46. Opletalová, V. Anthelmintika. In *Farmaceutická chemie IV*. 1.vydání Praha: Karolinum, 2006. kapitola 1.7, 156-164, ISBN 978-80-246-1169-3.
47. Peruzzia, E.; Maccia, C.; Donia, S.; Masciandaro, G.; Peruzzi, P.; Aiello, M.; Ceccantia, B.. *Phragmites australis* for sewage sludge stabilization. *Desalination* 246, 2009, 110–119.
48. Peverly, J.H.; Surface, J.M.; Wang, T. Growth and trace metal absorption by *Phragmites australis* in wetlands constructed for landfill leachate treatment. *Ecological Engineering* 5, 1995, 21-35.
49. Prichard, R. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 54, 1–3, Special Issue: 14th W.A.A.V.P. Conference, 1994, 259–268.
50. Sangster, N.C. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology* 29, 1999, 115-124.
51. Shimabukuro, R.H.; Walsh, W.C.; Hoerauf, R.A. Metabolism and selectivity of diclofop-methyl in wild oat and wheat. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1979, 615–623.
52. Schröder, P.; Daubner, D.; Maier, H.; Neustifter, J.; Debus, R. Phytoremediation of organic xenobiotics – Glutathione dependent detoxification in *Phragmites* plants from European treatment sites. *Bioresource Technology* 99, 2008, 7183–7191.
53. Siciliano, S.D.; Germida, J.J.; Banks, K.; Greer, C.W. Changes in microbial community composition and function during a polycyclic aromatic hydrocarbon phytoremediation field trial, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2003, 483–489.
54. Sriseadka, T.; Wongpornchai, S.; Rayanakorn, M. Quantification of flavonoids in black rice by liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agricult. Food Chem.* 60, 2012, 11723-11732.
55. SÚKL : Reálné využití léčiv v ČR Zář 2012, Závěrečná zpráva z exkluzivního výzkumu pro SÚKL, Lajková, A.; Körnerová, G. STEM/MARK, a.s. [cit. 10.6.2013]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/sukl/realne-vyuziti-leciv?highlightWords=spot%C5%99eba+1%C3%A9%C4%8Div>.
56. Susarla, S.; Medina, V.F.; McCutcheon, S.C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18, 2002, 647–658.

57. Svendsen, T.S.; Hansen, P.E.; Sommer, C.; Martinussen, T.; Gronvold, J.; Holter, P. Life history characteristics of *Lumbricus terrestris* and effects of the veterinary antiparasitic compounds ivermectin and fenbendazole. *Soil Biol.Biochem.* 37, 2005, 927–936.
58. Šantrůčková, H.; Pícek, T.; Šimek, M.; Bauer, V.; Kopecký, J.; Pechar, L.; Lukavská, J.; Čížková, H. Decomposition processes in soil of a healthy and a declining *Phragmites australis* stand. *Aquatic Botany* 69, 2001, 217–234
59. Tian, Z.; Zheng, B.; Liu, M.; Zhang, Z. *Phragmites australis* and *Typha orientalis* in removal of pollutant in Taihu Lake, China. *Journal of Environmental Sciences* 21, 2009, 440–446.
60. Valipour, A.; Raman, V.K.; Ghole, V.S. A new approach in wetland systems for domestic wastewater treatment using *Phragmites* sp. *Ecological Engineering* 35, 2009, 1797–1803.
61. Van Dillewijn, P.; Caballero, A.; Paz, J.A.; González-Pérez, M.M.; Oliva, J.M.; Ramos, J.L. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene under field conditions, *Environ. Sci. Technol.* 41, 2007, 1378–1383.
62. Vymazal, J.; Kröpfelová, L. Growth of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic. *Ecological Engineering* 25, 2005, 606–621.
63. Vymazal, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 380, 2007, 48–65.
64. Vymazal, J.; Kröpfelová, L.; Švehla, J.; Chrastný, V.; Štíhová, J. Trace elements in *Phragmites australis* growing in constructed wetlands for treatment of municipal wastewater. *Ecological Engineering* 35, 2009, 303–309.
65. Wienkoop, S.; Baginsky, S.; Weckwerth, W. *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research. *Journal of Proteomics* 73, 11, 2010, 2239–2248.
66. Wikipedia. - *Arabidopsis thaliana*. [cit. 21.6.2013]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana.