

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

VLIV NANOČÁSTIC NA PROTEOM ROSTLIN

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Lenka Matějková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

Hradec Králové

.....

Ráda bych poděkovala své konzultantce RNDr. Radce Podlipné, Ph.D. za umožnění práce v Laboratoři rostlinných biotechnologií Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR v Praze. Děkuji za její vstřícnost a cenné rady při řešení úkolu a vyhodnocování výsledků. Děkuji i ostatním pracovníkům laboratoře za jejich pomoc či radu. Dále bych chtěla poděkovat své školitelce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za ochotu a připomínky při vypracování diplomové práce.

Výzkum popsany v této práci je součástí projektu MŠMT COST LD-14100 „Toxicita nanočástic pro mokřadní rostliny“. Cílem projektu je stanovení vlivu nanočástic na růst, vývoj a fytoimediační potenciál mokřadních rostlin s ohledem na jejich použití v kořenových čistírnách odpadních vod.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lenka Matějková

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv nanočástic na proteom rostlin

Životní prostředí je kontaminováno stále větším množstvím různých typů xenobiotik. Poměrně „novou“ skupinou kontaminantů jsou nanomateriály. Účinnou metodou při dekontaminaci životního prostředí může být fytoremediace, která využívá vyšší rostliny k biotransformaci a ukládání kontaminantů. Rostlina vhodná pro fytoremediaci dokáže kontaminant přijmout, metabolizovat a uložit, aniž by byl zásadně narušen její metabolismus. Ovlivnění funkce a stavby rostliny lze pozorovat již na úrovni proteomu. V této práci byl pozorován vliv nanočástic oxidu měďnatého (CuO) na proteom huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Pro porovnání byl sledován i vliv standardních částic CuO a iontové sloučeniny síranu měďnatého (CuSO₄) v jednodenním a čtyřdenním časovém období. Proteomy byly vzájemně srovnány a změny vyhodnoceny pomocí softwaru PDQuest. Změny intenzit jednotlivých spotů proti kontrolnímu vzorku odpovídaly změnám v množství různých rostlinných proteinů v závislosti na typu částice a době působení. Toxický vliv na rostliny se projevuje např. snížením obsahu stavebních proteinů nebo proteinů účastnících se fotosyntézy. Naproti tomu se zvyšuje obsah proteinů podílejících se na stresové reakci. Jednodenní působení oxidu měďnatého ve standardní formě (bulk) způsobilo snížení intenzity šesti proteinových spotů a zvýšení intenzity u čtyř spotů. Proteom ovlivněný nanočásticemi oxidu měďnatého ukázal snížení intenzity osmi spotů a zvýšení pouze u třech spotů. Delší vliv oxidu měďnatého ve standardní i nanoformě způsobil snížení intenzity téměř všech spotů. Po krátkodobém účinku měďnaté soli byla intenzita mnoha proteinových spotů zvýšena. Na proteomu ovlivněném měďnatou solí po dobu čtyř dnů bylo detekováno jen pár spotů, všechny se sníženou intenzitou. Vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že nanoforma oxidu měďnatého je toxicitější než bulk forma. Sůl byla použita pouze pro porovnání, protože její toxicita byla očekávána.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Lenka Matějková

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of nanoparticles on plant proteome

The environment is contaminated by increasing amounts of different types of xenobiotics. Nanomaterials are relatively “new” group of pollutants. Effective method used for decontamination of the environment can be phytoremediation which uses higher plants for biotransformation and accumulation of pollutants. The plant is suitable for phytoremediation when it can absorb, metabolize and store contaminants without significant impact on its metabolism. Influence on the function and construction of the plant can be detected at the proteome level. In this work, we observe the effect of copper oxide nanoparticles on plant proteome of *Arabidopsis thaliana*. The effect of standard copper oxide particles and copper sulfate ions was also studied in one-day and four-day period for comparison. The proteomes were compared and changes were analyzed by software PDQuest. Changes in intensity of protein spots comparing to the control sample correspond to modulation of the amount of different types of plant proteins. This modulation depends on the particle type and time of acting. Toxic effect on plants is manifested for example by reducing the amount of structural proteins or proteins involved in photosynthesis. Conversely, the amount of proteins involved in stress response was increased. One day treatment by bulk copper oxide caused decrease of intensity of six protein spots and four spots were increased. Proteome influenced by copper oxide nanoparticles shows decrease of intensity of eight spots and increase of only three spots. Longer influence of both copper oxide nanoparticles and bulk form caused a decrease of almost all spots. After short acting of copper salt a lot of protein spots were increased. On proteome exposed to copper salt for four days were detected only a few spots with decreased intensity. By comparing the results, it was found that nanoparticles are more toxic than bulk form of copper oxide. Salt was used only for comparing, because its toxicity was expected.

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Huseníček rolní	9
2.2	Fytoremediace	10
2.2.1	Fytoremediační techniky a jejich využití	11
2.2.2	Mechanismus fytoremediace	13
2.2.3	Zvýšení účinnosti fytoremediace	14
2.2.4	Rostliny užívané při fytoremediaci	14
2.3	Nanočástice	15
2.3.1	Charakteristika	15
2.3.2	Vliv nanočástic na životní prostředí	17
2.3.3	Vliv nanočástic na lidský organismus	18
2.3.4	Vliv nanočástic na rostliny	18
2.4	Měď v rostlinách	19
2.5	Proteomika	20
2.5.1	2D-elektroforéza	21
2.5.2	Hmotnostní spektrometrie	23
3	CÍL PRÁCE	25
4	PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE	26
4.1	Přístroje	26
4.2	Pomůcky	26
4.3	Chemikálie	27
5	METODIKA	28
5.1	Kultivace rostlin <i>in vitro</i>	28
5.1.1	Příprava média	28
5.1.2	Sterilizace semen a výsev	29
5.1.3	Přesazování	30
5.2	Ovlivnění rostlin částicemi kovu	30
5.3	Zpracování vzorků	31
5.3.1	Homogenizace	31
5.3.2	Extrakce proteinů	32
5.3.3	Solubilizace proteinů	33
5.3.4	Měření koncentrace proteinů	33

5.4	2D-elektroforéza	34
5.4.1	Isoelektrická fokusace.....	34
5.4.2	Ekvilibrace.....	35
5.4.3	Elektroforéza.....	36
6	VÝSLEDKY	38
6.1	Jednodenní inkubace	39
6.1.1	Vliv CuO ve standardní formě – „bulk“	39
6.1.2	Vliv CuO v nanoformě – „nano“	40
6.1.3	Vliv CuSO ₄ – „sůl“	41
6.1.4	Porovnání vlivu CuO ve standardní a nanoformě	42
6.2	Čtyřdenní inkubace	43
6.2.1	Vliv CuO ve standardní formě – „bulk“	43
6.2.2	Vliv CuO v nanoformě – „nano“	44
6.2.3	Vliv CuSO ₄ – „sůl“	45
6.2.4	Porovnání vlivu CuO ve standardní a nanoformě	46
6.3	Porovnání jednodenní a čtyřdenní inkubace	47
6.3.1	Rozdíl jednodenního a čtyřdenního působení CuO ve standardní formě	47
6.3.2	Rozdíl jednodenního a čtyřdenního působení CuO v nanoformě ...	48
6.3.3	Rozdíl jednodenního a čtyřdenního působení CuSO ₄	49
7	DISKUZE	50
8	ZÁVĚR	57
9	SEZNAM ZKRATEK	58
10	LITERATURA	59

1 ÚVOD

Závažným problémem současnosti je stále se zvyšující riziko znečištění životního prostředí. Jedním z možných kontaminantů jsou nanočástice těžkých kovů. Nanočástice jsou struktury, které alespoň ve dvou rozměrech nepřesahují 100 nm (Cyrusová a kol. 2015). Ve většině případů se jedná o produkty lidské činnosti, ale mohou též vznikat přirozenou cestou (Sovová a Kočí 2012). V přírodě se pak ukládají v půdě, vodě a sedimentech, odkud se dostávají do rostlin a prostřednictvím potravního řetězce mohou přecházet i do živočišných organismů (Cyrusová a kol. 2015). Do lidského organismu pronikají nejen epitelem trávicí soustavy, ale i dýchacím systémem a skrz kůži. V lidském těle mohou působit jako patogeny různých nemocí (Nohavica 2011), proto je třeba tyto kontaminanty z životního prostředí odstraňovat. Jednou z šetrných a levných metod odstraňování nežádoucích látek z životního prostředí je fytořemediace (Kučerová a kol. 1999), která využívá fyziologických funkcí rostlin (Pivetz 2001). Rostliny dokáží některé toxiny akumulovat, nebo degradovat na méně toxické produkty (Kučerová a kol. 1999). Podmínkou fytořemediace je zajištění, aby nedošlo ke kontaminaci jiných složek životního prostředí (Pivetz 2001).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huseníček rolní

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je řazen do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Je to jednoletá bylina s přízemní listovou růžicí. Má přímou, často větvenou lodyhu a dosahuje výšky 5-30 cm. Listy přízemní růžice mají eliptický tvar a přisedají zúženou bází. Květy tvoří hrozen. Kališní lístky jsou žlutozelené s namodralou špičkou a lístky korunní jsou bílé 2-4 mm dlouhé. Plodem je šešule. Jedná se o efemerní rostlinu schopnou dokončit svůj životní cyklus za velmi krátkou dobu několika dnů (Hanzl 2008) (Obr. 1).



Obr. 1 *Arabidopsis thaliana* – a) celá rostlina, b) květenství, c) listová růžice (Racek 2012)

Druh je rozšířen téměř v celé Evropě kromě severní oblasti Skandinávie a Ruska. Vyskytuje se i v Asii a Africe. Druhotně byl zavlečen i do Severní Ameriky a Austrálie. V České republice se vyskytuje hojně s výjimkou horských oblastí. Roste na polích, rumišťích, na okrajích cest, u železničních tratí a na skalnatých a kamenitých svazích (Hoskovec 2007).

Huseníček získal výsadní postavení v genetice rostlin, protože splňuje všechny podmínky modelového organismu. Je snadno kultivován v laboratorních podmínkách i v podmínkách *in vitro*. Má velmi krátkou generační dobu (6-8 týdnů) a umožňuje tak získat 6-8 generací ročně. Jedna rostlina je schopna vyprodukovat až několik tisíc semen. Jeho genom je velikostí srovnatelný s genomem živočišného modelového organismu *Drosophyla melanogaster* (Řepková 2007).

2.2 Fytoremediace

Spolu s rozvojem vědy a techniky začaly vznikat látky syntetizované člověkem, tzv. xenobiotika. Zpravidla byly nové látky průmyslově významné, avšak postupem času bylo zjištěno, že se tyto látky hromadí v životním prostředí, dostávají se do potravního řetězce a stávají se nebezpečnými nejen pro člověka (Kučerová a kol. 1999). Mezi průmyslově významné znečišťující látky řadíme zejména látky organického původu. Jako příklad lze uvést polychlorované bifenyly (pesticidy), polycyklické aromatické uhlovodíky (produkty nedokonalého spalování), nitroaromáty (výbušniny) nebo polychlorované alifatické uhlovodíky (freony). Většina těchto látek působí nejen toxicky, ale i teratogenně nebo karcinogenně. Z řad anorganických látek, které mohou tvořit rezidua v životním prostředí, to jsou zejména těžké kovy a radionuklidy (Meagher 2000).

Jednou z metod odstraňování těchto kontaminantů z půdy a vod je fytoremediace. Jedná se o využití zelených rostlin k akumulaci a odstraňování kontaminantů z životního prostředí (Kučerová a kol. 1999). Fytoremediace využívá přirozených procesů v rostlinách (Pivetz 2001). Je to poměrně levná a šetrná metoda dekontaminace znečištěných ploch. Rostliny dokážou absorbovat anorganické i organické látky a akumulovat je v tkáních. Jednou ze strategií fytoremediace je fytodekontaminace, kdy rostliny akumulují kontaminanty v tkáních, následně jsou sklizeny a je s nimi nakládáno jako s odpadem. Druhou strategií je fytodegradace, kdy jsou rostliny schopny akumulované kontaminanty pomocí svého metabolismu degradovat na méně toxické produkty, které pak zabudují do svých struktur (Kučerová a kol. 1999), zejména do vakuol a buněčné stěny (Příbylová 2014). V případě organických polutantů je cílem fytoremediace tyto látky mineralizovat na relativně netoxické látky, jako je oxid uhličitý, dusičnany, chlor a amoniak. U anorganických látek se předpokládá akumulace toxické látky ve formě iontů v nadzemní části rostliny (Meagher 2000). Na procesu fytoremediace se podílejí i mikroorganismy žijící v symbióze s kořenovým systémem rostlin (Jirků 2012). Během fytoremediace je nutné zajistit, aby nedošlo k přenosu kontaminace na jinou složku životního prostředí (Pivetz 2001). Výhody a nevýhody fytoremediace jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1 Výhody a nevýhody fytoremediace (Pivetz 2001, Ozcan a kol 2012, Soudek a kol. 2008)

Výhody	Nevýhody
nízké ekonomické náklady	omezenost rozsahem kořenového systému
šetrnost k životnímu prostředí	časová náročnost závislá na růstu biomasy
možnost využití <i>in situ</i>	složitá likvidace kontaminované biomasy
není destruktivní vliv na úrodnost vegetace může snižovat erozi	fytotoxicity vysokých koncentrací nečistot
lze kombinovat s „klasickými“ dekontaminačními technologiemi	množství biomasy (kontaminanty snižují růst)
pasivní metoda	nízký transport kontaminantů z kořenů do nadzemních částí (kořeny nelze sklídit)
využití solární energie	nebezpečí kontaminace potravního řetězce
vyšší akceptovatelnost veřejným míněním („zeleň“)	nedostatek rostlinných druhů
	ztráta účinnosti v zimním období, nepříznivém počasí, vlivem škůdců nebo onemocněním rostlin

2.2.1 Fytoremediační techniky a jejich využití

Fytoremediace může probíhat v rostlině různými způsoby. Jedná se o fytodegradaci, rhizodegradaci, fytostabilizaci, fytoakumulaci, rhizofiltraci a fytovolatilizaci (Obr. 2). Ve většině případů dochází ke kombinaci více metod.

Fytodegradace. Jde o proces, kdy k přeměně kontaminantů dochází uvnitř rostliny. Využívá se při odstraňování organických látek z životního prostředí. Je třeba dát pozor, aby vzniklé metabolity nebyly toxičtější než původní kontaminanty (Soudek a kol. 2008). Rostlinné enzymy, které se účastní fytodegradace, zahrnují např. dehalogenasu, nitroreduktasu, peroxidasu a další (Pivetz 2001).

Rhizodegradace. Metoda spočívá ve zvýšení počtu půdních bakterií. Kořeny rostlin vylučují do půdy organické sloučeniny (např. cukry, aminokyseliny, růstové faktory), které se stávají potravou pro bakterie. Díky dostatku živin, roste počet bakterií, které jsou schopny odbourávat okolní kontaminanty (Soudek a kol. 2008). K degradaci nečistot dochází mimo rostlinu, proto není třeba sklizeň a likvidace biomasy (Pivetz 2001).

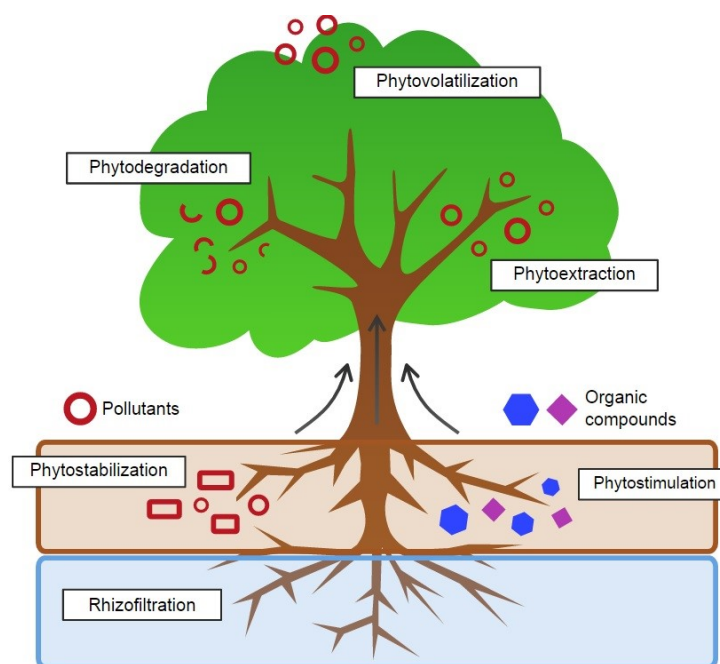
Fytostabilizace. Kořenový systém rostlin brání vymývání kontaminantů z půdy do podzemních vod a vodních toků. Rostliny svým vzrůstem rovněž zabraňují vodní a větrné erozi a zabraňují tak rozptylu kontaminace po povrchu (Soudek a kol. 2008). Při fytostabilizaci dochází k zadržování nečistot na daném místě. Vyžaduje proto rostliny, které budou schopny růst v kontaminované půdě. Je zaměřena především na dekontaminaci olova, chromu a rtuti (Pivetz 2001).

Fytoakumulace (fytoextrakce). Kořeny absorbují kontaminanty z půdy, které se poté akumulují v nadzemní části rostliny. Rostliny s akumulovanými kontaminanty jsou sklizeny a je s nimi nakládáno jako s odpadem (Soudek a kol. 2008). Metoda se využívá při dekontaminaci kovů (Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn), polokovů (As, Se), radionuklidů (^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{234}U , ^{238}U) a nekovů (B). K fytoakumulaci dochází zejména u anorganických látek, protože organické jsou v rostlině metabolizovány. Primární využití fytoakumulace je při sanaci oblastí s nebezpečným odpadem (Pivetz 2001).

Rhizofiltrace. Metoda slouží k odstraňování kontaminant z povrchových a splaškových vod s využitím kořenového systému rostlin. Kontaminanty jsou kořenovým systémem absorbovány, nebo precipitují na jeho povrchu. Využívá se při znečištění velkého objemu vody malými koncentracemi kontaminant (Soudek a kol. 2008). Podobně jako u fytoakumulace dochází k ukládání nečistot s tím rozdílem, že u rhizofiltrace jsou cílovým orgánem kořeny. S rostlinnou biomasou se opět nakládá jako s odpadem. Metoda je využitelná pro kovy a radionuklidy (Pivetz 2001).

Fytovolatilizace. Kontaminanty jsou přijímány kořenovým systémem a transportovány do nadzemní části rostliny. Následně jsou převedeny na těkavou formu a opět rostlinou uvolněny. Při fytovolatilizaci nedochází k odstranění kontaminant, ale pouze k jejich přesunu z půdy do ovzduší (Soudek a kol. 2008). Před uvolněním těkavé formy do atmosféry dochází k částečné degradaci, nebo transformaci kontaminantů na méně toxické produkty (Pivetz 2001).

Kontaminovaná půda může být čištěna pomocí fytoakumulace, fytostabilizace, rhizodegradace, fytodegradace i fytovolatilizace. Fytoremediace je vhodná pro velké plochy s relativně tenkou povrchovou vrstvou kontaminované půdy, která je dostupná kořenovému systému rostlin. Nečistoty uložené v hlubších vrstvách půdy nelze degradovat rostlinami. Zároveň nesmí být koncentrace znečištění příliš vysoká. U povrchových a odpadních vod se využívá rhizofiltrace, fytoakumulace a fytodegradace. V případě, že je kontaminovaná voda použita k zavlažování, přestoupí kontaminace do půdy a může být využita i rhizodegradace a fytostabilizace (Pivetz 2001).



Obr. 2 Fytoremediační techniky (Wikipedia)

2.2.2 Mechanismus fytoremediace

Rostliny jsou schopny pomocí specifických mechanismů přijímat z okolního prostředí makronutrienty a esenciální mikro nutrienty jako živiny a udržovat si fyziologické rozmezí jejich koncentrace. Proto rostliny dovedou snadno přijímat různé ionty z prostředí, ať už mechanismem přímo pro ně určeným, nebo určeným pro analogický iont (např. kadmium je přijímáno jako vápník a selen jako síra). Rostliny, které jsou schopny akumulovat vysoké koncentrace iontů, se nazývají hyperakumulátory (Pivetz 2001, Soudek a kol. 2008). Jako příklad hyperakumulátoru lze uvést penízek modravý (*Thlaspi cearulescens*), který je schopen akumulovat vysoké množství kadmia (Salava 2013). Mechanismus fytoremediace těžkých kovů lze tedy popsat jako jejich odstranění z půdy transportem a uložením v rostlinných tkáních. Aby byly anorganické i organické nečistoty rostlinou absorbovány, musí být ve formě vodného roztoku (Pivetz 2001, Soudek a kol. 2008).

Při fytoremediaci organických látek dochází k jejich degradaci v rostlině. Aby mohly být organické látky rostlinou degradovány, musí pro ni být biologicky dostupné. Dostupnost kontaminant závisí na typu půdy, lipofilitě, rozpustnosti, polaritě a molekulové hmotnosti sloučenin a jejich stáří, tj. jak dlouho byly ve styku s půdou. Čím delší byla expozice půdy toxickým látkám, tím hlubší byl jejich průnik do částic

půdy a vznikla pevnější vazba. Metabolismus organických látek v rostlině probíhá obdobně jako metabolismus živočichů. V první fázi dochází k oxidaci, redukci nebo hydrolýze substrátu za vzniku rozpustnější formy. Zároveň jsou do molekuly zavedeny reakční skupiny umožňující konjugaci nejčastěji s cukry (druhá fáze). Nakonec jsou hydrofilní kojugáty v rostlinách ukládány, na rozdíl od živočichů, kde dochází k jejich vylučování. Rozpustné konjugáty jsou ukládány ve vakuolách a nerozpustné v buněčné stěně (Kučerová a kol. 1999, Pivetz 2001).

2.2.3 Zvýšení účinnosti fytořemediace

Zvýšení účinnosti fytořemediace souvisí a agronomickými znalostmi. Důležitá je podpora produkce biomasy hnojením, selekcí rostlin, hustotou rostlin při výsadbě, střídáním plodin na poli, hubením škůdců a zavlažováním. Dále se využívá genetická modifikace rostlin, kdy se kombinují výhodné vlastnosti různých rostlinných druhů. Nejčastěji jsou vnášeny geny hyperakumulátorů do rostlin s rychlým růstem nebo velkou produkcí biomasy (Soudek a kol. 2008).

2.2.4 Rostliny užívané při fytořemediaci

Fytořemediace oblastí kontaminovaných různými organickými nebo anorganickými látkami vyžaduje pokaždé jiný rostlinný druh. Velmi vhodné jsou rostliny čeledi *Salicaceae*. Jedná se o stromy (topoly a vrby), které velmi rychle rostou a jsou odolné. Hybridní topoly se využívají pro dekontaminaci organických látek, snášejí vysoké koncentrace organických nečistot, avšak vyšší koncentrace kovů a jejich solí jsou pro ně toxické. Hybridní topoly druhu *Populus deltoides nigra* mají modifikovaný kořenový systém pro růst do hloubky. Mohou tak snižovat i kontaminaci spodních vod. Využívají se zejména ke snižování koncentrace dusičnanů. Topoly zároveň snižují hladiny prашných škodlivin.

Dalším příkladem je stolístek vodní (*Myriophyllum aquaticum*) obsahující enzym trinitrátoreduktasu. Je vysazován v oblastech s výskytem trinitrotoluenu. Bylo zjištěno, že podél okrajů kontaminovaných oblastí prorůstají kořeny stolístku hlouběji a mohou tak vycytávat škodliviny i z hlubších vrstev vody. Své využití ve fytořemediaci nalezne i tolice vojtěška (*Medicago sativa*), která vycytává

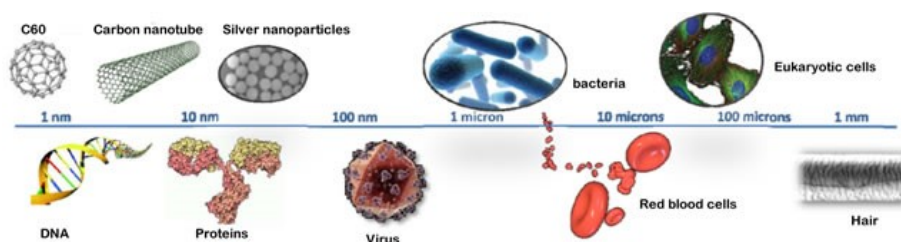
chlorované organické sloučeniny. Vysokou schopnost akumulace dibenzofuranů z půdy vykazují rod *Cucurbita* (dýně, cuketa), ze vzduchu pak rod *Cucumis* (okurka).

Rostliny mohou být využívány i při identifikaci a stanovení koncentrace nečistot ve vzduchu. K takovým účelům se využívá například *Pinus sylvestris* (borovice lesní), která dokáže akumulovat kyselinu trichloroctovou jako emisi některých papíren. Dále pak rody *Juglans* (ořešák), *Quercus* (dub) a *Acer* (javor) ke stanovení koncentrace polychlorovaných bifenylnů (PCB), které se kumulují v kůře stromů (Kučerová a kol. 1999).

2.3 Nanočástice

2.3.1 Charakteristika

Jestliže velikost částic alespoň ve dvou rozměrech nepřesahuje 100 nm, lze je označit jako nanočástice (obr. 3). Jejich produkcí a využíváním se zabývá obor nanotechnologie (Cyrusová a kol. 2015). Na skutečnost, že celá příroda funguje na úrovni atomů a molekul poukázal jako první významný americký fyzik a nositel Nobelovy ceny Richard Feynman ve své přednášce „There is Plenty of Room at the Bottom“ přednesené v roce 1959 (Navrátil 2008). Nejedná se o nové látky, ale pouze o nové rozměry již existujících látek. Jsou to právě rozměry částic v řádech nanometrů, které dávají látkám nové nebo lepší vlastnosti (Sovová a Kočí 2012). Změna vlastností souvisí s velikostí povrchu částic. Snižuje se počet povrchových atomů a vazeb mezi nimi a dochází tak ke zvýšení vazebné energie a v důsledku toho i ke zvýšení chemické reaktivity (Kerberová 2015).



Obr. 3 Porovnání velikosti nanočástic (AZONANO)

Nanočástice nejsou pouze produkty lidské činnosti, ale vznikají i v přírodě již od pradávna (Sovová a Kočí 2012). Lze je proto rozdělit do dvou skupin, a to na přírodní a antropogenní (Kerberová 2015). Mezi hlavní zdroje přírodních nanočástic patří lesní požáry, vulkanická činnost, eroze a biologické procesy. Lidská činnost má

vliv na vznik nanočástic zejména spalovacími procesy motorových vozidel a letecké dopravy, v průmyslu a energetice (Sovová a Kočí 2012). V případě tryskových motorů klesají částice k zemi poměrně dlouho a zároveň se shlukují do méně toxických aglomerátů (Nohavica 2011). U motorových vozidel navíc dochází k uvolňování nanočástic opotřebáváním pneumatik. Sekundárně vznikají nanočástice chemickými reakcemi v atmosféře s plynnými produkty spalování (Nohavica 2011). Uměle syntetizované nanomateriály jsou látky, které se v nanoformě dříve v přírodě nevyskytovaly (Sovová a Kočí. 2012).

Nanomateriály můžeme rozdělit na nanomateriály na bázi kovů (např. Au, Ag, Cu) a oxidů kovů (např. ZnO, TiO₂, CeO₂, CuO) a nanomateriály na bázi uhlíku (nanotrubice, fullereny) (Cyrusová a kol. 2015). Nejčastěji se používají nanočástice přechodných kovů (Ag, Fe), oxidů kovů (Zn, Ti, Ce), křemíku a uhlíku (Sovová a Kočí 2012).

V minulosti byly nanočástice zlata a stříbra v Persii používány při výrobě třpytivých keramických glazur a v Egyptě užívali nanočástice zlata k duševní a tělesné očištění (Nohavica 2011). Nyní nacházejí nanomateriály uplatnění v mnoha oblastech běžného života (Navrátil 2008). Antibakteriální vlastnosti stříbra jsou využívány v textilním průmyslu při výrobě ponožek a vložek do bot a ve zdravotnictví do antimikrobních přípravků jako prevence bakteriální kontaminace katetrů, protéz a lidské kůže. Nanočástice oxidu titaničitého jsou díky své schopnosti pohlcovat UV záření přidávány do kosmetiky a opalovacích krémů, dále jako bílý pigment do nátěrových hmot. Měď našla uplatnění ve strojírenském průmyslu při výrobě mazadel ke zmírnění tření mezi kovovými povrchy. Nanočástice zinku slouží v chemickém průmyslu jako katalyzátory chemických reakcí a ve formě oxidu podobně jako titan. V optice byly díky nanočásticím objeveny nové zdroje laserových světel a optických systémů (Kerberová 2015, Nohavica 2011). Další uplatnění nacházejí nanočástice v elektronice, automobilovém a leteckém průmyslu, při remediačních a dekontaminačních procesech, v kosmickém průmyslu a dalších odvětvích (Navrátil 2008, Sovová a Kočí 2012).

2.3.2 Vliv nanočástic na životní prostředí

S rostoucím využíváním nanočástic roste i riziko jejich emisí do životního prostředí. Přírodní nanočástice mohou mít na životní prostředí toxický vliv, proto se předpokládá, že uměle vyrobené nanočástice budou toxické také. Je dokázáno, že nanoforma různých látek je významně toxičtější než forma klasická, protože toxicita souvisí s velikostí částic a jejich povrchu. Nanočástice jsou ukládány v ovzduší, vodě, půdě a sedimentech. Největším rezervoárem všech typů nanočástic jsou pobřežní oblasti. Nejen v důsledku kosmetiky na opalování, ale také proto, že do moře míří většina průmyslového odpadu (Sovová a Kočí 2012). Nanočástice mohou mít širokospektrální dopad na životní prostředí a potravní řetězec díky své malé velikosti a vysoké reaktivitě.

Zdrojem kontaminace pro rostliny je půda, voda a vzduch. Obsahují-li tyto složky životního prostředí nanočástice, dochází snadno k jejich přechodu do rostlin (Cyrusová a kol. 2015). Rostliny je absorbují kořenovým systémem nebo povrchem listů (Jirků a kol. 2012). K přenosu do jiných organismů dochází prostřednictvím dýchání a potravního řetězce. Stále není známo, která složka životního prostředí může být největším rezervoárem a může se stát nejvíce nebezpečnou z hlediska přenosu kontaminace (Kerberová 2015). Již pračlověk nevědomě inhaloval nanočástice vznikající při požárech nebo sopečných erupcích. Je pravděpodobné, že si lidský organismus postupem času vytvořil samočistící mechanismus, kterým dokáže do jisté míry chránit plíce před inhalovanými kontaminanty (Nohavica 2011).

V závislosti na působících faktorech mohou nanočástice vstupující do životního prostředí tvořit méně toxické agregáty. Jako příklad faktorů ovlivňujících agregaci lze uvést salinitu vody. Salinita zvyšuje schopnost agregace nanočástic, proto v mořské vodě vznikají agregáty stabilnější. Dále pak pH, koncentrace, teplota a proudění, které ovlivňují četnost srážek mezi částicemi. Čím častější jsou srážky, tím větší je pravděpodobnost vzniku agregátů. Mezi faktory, které naopak brání shlukování, řadíme huminové látky obsažené v půdě, různé proteiny, polymery a povrchově aktivní látky. Takové látky se přidávají cíleně do produktů s průmyslově vyráběnými nanočásticemi, aby se zabránilo nežádoucí tvorbě agregátů (Sovová a Kočí 2012). Při zkoumání údelu a chování nanočástic v životním prostředí je nutné se zabývat i jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi (např. velikost povrchu, povrchová aktivita, chemické složení, hmotnost, tvar). Důležitá je jejich rozpustnost ve vodě, která souvisí se schopností

dispergace v různém prostředí. Čím větší je schopnost dispergace v určité složce životního prostředí, tím vyšší je možnost expozice organismů těmto částicím (Kerberová 2015). Velký specifický povrch nanočástic může hrát roli v transportu jiných kontaminantů prostředím. Adsorpce kontaminantů na nanočástice je cíleně využívána ke snižování kontaminace. K tomuto účelu se využívají zejména uhlíkové nanočástice ve formě fullerenu a nanotrubic (Sovová a Kočí 2012).

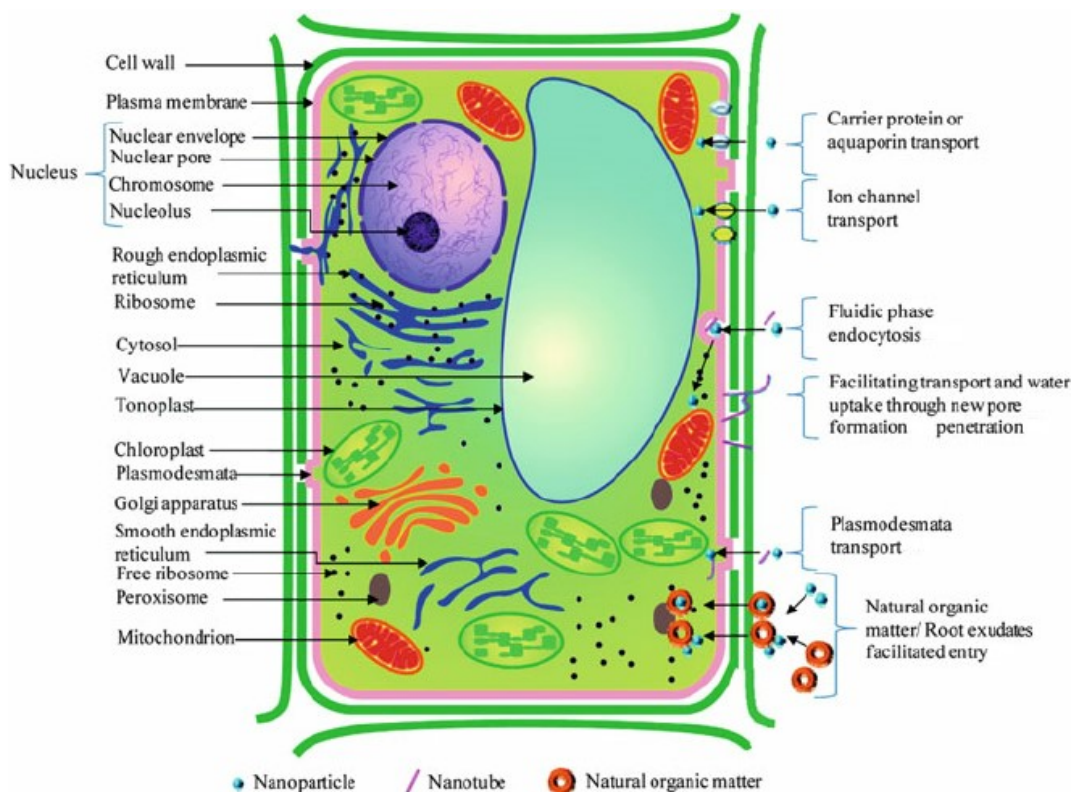
2.3.3 Vliv nanočástic na lidský organismus

Toxicita nanočástic pro lidský organismus je dána jejich přechodem přes epiteliální bariéru. Podobně jako u rostlin toxicita závisí na rozměru, chemickém složení, povrchové aktivitě částic a na celistvosti epitelu. Nanočástice mohou prostupovat přes epitel trávicího traktu prostřednictvím potravního řetězce nebo respiračním epitelem při inhalaci cigaretového kouře, prachových částic nebo znečištěného vzduchu. Další cestou pro vstup nanočástic je spojivkový epitel oka a kožní epitel. Nanočástice pronikají do mitochondrií, kde aktivují předčasnou apoptózu. Mohou také aktivovat makrofágy k sekreci enzymů způsobujících záněty. V organismu mohou nanočástice působit jako patogeny různých nemocí. Mohou být původci alergie, astmatu, ekzému, zánětlivého onemocnění střev, celiakie nebo rakoviny (Nohavica 2011).

2.3.4 Vliv nanočástic na rostliny

Nanočástice z atmosféry se shlukují na povrchu rostliny a poté pronikají skrz průduchy dovnitř. Půdní nanočástice interagují s kořenovým systémem, pronikají pokožkou a po dosažení cévního systému putují do nadzemních částí. Průchod rostlinou je zprostředkován např. pomocí proteinových přenašečů, iontovými kanály nebo endocytózou. Většina kovových nanočástic prostupuje iontovými kanály přímo určenými pro přirozený příjem kovů ve formě živin. Sklon nanočástic prostupovat buněčnými bariérami a interagovat s vnitrobuněčnými strukturami je dán zejména jejich malou velikostí a vysokou povrchovou reaktivitou. S tím souvisí i jejich fytotoxické působení, které se nejčastěji projevuje indukci oxidačního stresu (Cyrusová a kol. 2015). Nanočástice mohou také pronikat do rostliny spolu s organickými látkami, na které jsou navázány. Uvnitř rostliny jsou nanočástice přepravovány prostřednictvím

plasmodesmat (obr. 4). Interakce nanočástic s rostlinami závisí na druhu rostliny a na velikosti, typu, chemickém složení a stabilitě nanočástic (Rico a kol. 2011).



Obr. 4 Možnosti průniku nanočástic do rostliny (Rico a kol. 2011)

2.4 Měď v rostlinách

Měď je základním esenciálním prvkem rostlin, působí jako kofaktor řady fyziologických procesů a je nutná pro normální růst a vývoj rostliny (Yruela 2005). Sloučeniny mědi se v přírodě vyskytují velmi často jako součást řady minerálů. Díky vazbě na půdní částice se měď kumuluje ve svrchních vrstvách půdy a může být snadno rostlinou akumulována (Babula a kol. 2010). Přestože je měď biogenním prvkem, je často pozorována i její vysoká toxicita, která je způsobena snadným průnikem měďnatých iontů do buňky a jejich schopností tvořit komplexy s řadou organických látek. Jako součást proteinů se účastní přenosu elektronů v procesu fotosyntézy a buněčného dýchání a je součástí enzymů nezbytných pro tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (Babula a kol. 2010). Může hrát významnou roli v syntéze a stabilitě chlorofylu a dalších rostlinných pigmentů. Účastní se i proteinového a sacharidového metabolismu buněčné stěny (Richter 2004). Koncentrace mědi v buňkách musí být udržována na nízké úrovni, kvůli její toxicitě. Průměrný obsah

v rostlinné tkáni se pohybuje kolem 10 $\mu\text{g/g}$ sušiny (Yruela 2005). Vyšší obsah byl zjištěn v listech, generativních orgánech, plodech a semenech (Richter 2004).

Typické příznaky nedostatku mědi se projevují nejprve na špičkách listů a pak se rozšiřují podél okraje listů dál. Listy mohou být zkroucené nebo špatně tvarované a vykazují chlorózu nebo dokonce nekrózu (Yruela 2005). Takto poškozené bývají hlavně staré listy, jelikož je měď ze starých listů přepravována do mladých. Dále se nedostatek mědi projevuje zastavením růstu a poruchou vnitřního tlaku, s čímž souvisí vadnutí rostliny (Richter 2004). Závažný nedostatek mědi působí degeneraci thylakoidních membrán chloroplastů a snížení obsahu pigmentů (Yruela 2005).

Nadbytek mědi podobně jako její nedostatek působí snížení růstu a inhibici respirace a fotosyntézy, se kterou souvisí i snížený obsah chlorofylu (Yruela 2005). Toxicita mědi se projevuje podobně jako nedostatek železa, protože měď negativně ovlivňuje jeho příjem (Babula a kol 2010). Vysoká koncentrace mědi také způsobuje oxidační stres rostlin jako odpověď na zvýšenou tvorbu kyslíkových radikálů (Yruela 2005).

2.5 Proteomika

Proteomika je dynamický obor, který se zabývá systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identity, množství a funkcí (Chmelík 2005). Cílem proteomiky je analyzovat všechny proteiny v buňkách, tkáních a tělních tekutinách za různých podmínek (Kovářová a kol. 2005) i ve velmi nízkých koncentracích. Je klíčem k systematickému studiu biologických dějů (Kovářová 2005). Zahrnuje identifikaci bílkovin, jejich interakce s jinými látkami a kvantitativní a kvalitativní stanovení změn jejich složení během biologických procesů (Chmelík 2005). Proteomické analýzy rostlinných orgánů a tkání byly aplikovány pro sledování vývojových změn nebo vlivu environmentálních podnětů na proteiny (Canovas a kol. 2004). Soubor všech proteinů určité buněčné struktury se nazývá proteom. Vedle celkového proteomu se rozeznává i proteom buněčný, tkáňový nebo proteom tělních tekutin (Kovářová a kol. 2005).

Proteomické studie jsou logickým pokračováním genomických analýz, protože znalost genů a jejich uspořádání není dostatečná pro pochopení všech aspektů živého organismu (Černý a kol. 2011). Proteom je zpravidla větší než genom, protože geny jsou různě přepisovány a proteiny dále modifikovány (Kovářová a kol. 2005). Jako

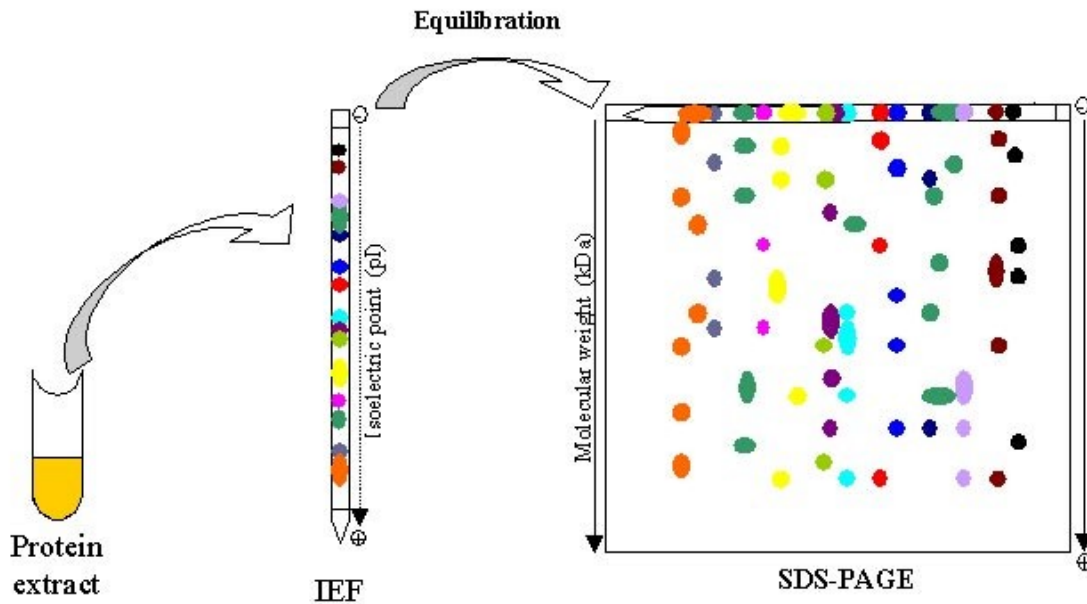
modelová rostlina je sledován huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Nejnižší odhady předpokládají, že k přibližně 25 000 genům existuje minimálně 100 000 různých proteinů. Zatímco sekvence genomu je již známa, sekvence proteomu je stále z velké části neidentifikována (Černý a Brzobohatý 2010). Jedna z nejobsáhlejších proteomických analýz *Arabidopsis thaliana* našla 13 029 různých proteinů, což odpovídá zhruba polovičnímu množství známých genů této rostliny (Černý a kol. 2011). Doposud však bylo identifikováno pouze cca 5 000 proteinů *Arabidopsis thaliana* (Skalák a kol. 2010). Jedním z důvodů, proč jsou počty detekovaných proteinů tak nízké, je přítomnost majoritních proteinů, které jsou v rostlině ve vysokých koncentracích a znemožňují tak detekci proteinů v malém množství. Jako příklad lze uvést fotosyntetický enzym Rubisco (ribulosabisfosfátkarboxylasa/oxygenasa), který je nejrozšířenějším proteinem v přírodě a v rostlině se jeho obsah pohybuje kolem 45 % (Černý a Brzobohatý 2010, Černý a kol. 2011). Z toho vyplývá, že proteomika je mnohem složitější než genomika (Kovářová a kol. 2005). Složení proteomu se během buněčného růstu neustále mění v závislosti na vlivu vnějšího prostředí a adaptaci rostlin nebo v průběhu nemoci (Kovářová 2005). Proteomická analýza dokáže detekovat změny v okamžité odpovědi organismu na podnět, které nemusí být závislé na regulaci genové exprese (Skalák a kol. 2010).

2.5.1 2D-elektroforéza

Hlavní metodou analytické proteomiky je dvourozměrná gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE). Využívá se k separaci proteinů a k získávání dvourozměrných proteinových map (Chmelík 2005). Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, které se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody (Holešinská 2006). Pohyblivost v elektrickém poli závisí na tvaru a velikosti molekuly, na jejím náboji a koncentraci (Hromadová 2014). Výsledkem elektroforetického dělení je proteinová mapa, kde má každý protein svou specifickou polohu (Kovářová a kol. 2005).

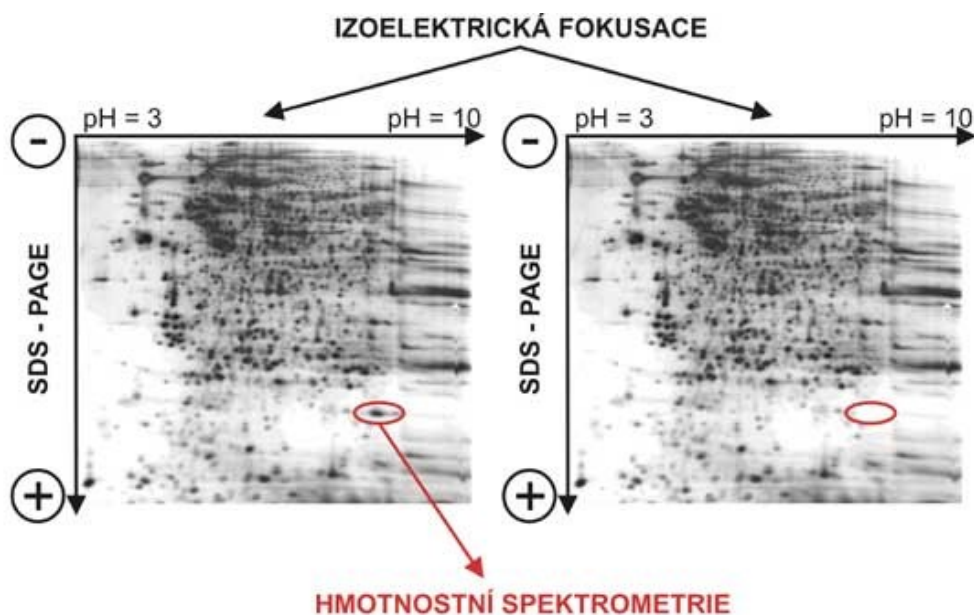
Dělení v prvním směru lze označit jako izoelektrickou fokusaci (IEF) (Obr. 5), kdy jsou proteiny odděleny na základě svého izoelektrického bodu (pI). Tento krok se provádí na gelovém pásu se stabilním pH gradientem (*BIO-RAD*). Každá molekula se vlivem elektrického napětí zastaví v místě, kde je pH gelového pásu rovno jejímu pI. V takovém okamžiku je celkový náboj molekuly nulový (Šeda a kol. 2006).

Před dělením v druhém rozměru dle hmotnosti jsou proteiny ošetřeny dodecylsíránem sodným (SDS) spolu s redukčními činidly. Dojde k rozvinutí proteinů do dlouhých přímých molekul spojených s SDS. Vzhledem k tomu, že molekuly SDS jsou negativně nabitě, získají všechny proteiny záporný náboj a přibližně stejný poměr náboje k hmotnosti molekuly (*Creative Proteomics*). Následuje elektroforéza na polyarylamidovém gelu (PAGE), kde je napětí aplikováno kolmo oproti isoelektrické fokusaci (Obr. 5). Dojde k rozdělení molekul dle velikosti (Šeda a kol. 2006).



Obr. 5 Princip dvourozměrné elektroforézy (*Creative Proteomics*)

Získané proteinové mapy jsou různými způsoby barveny, aby došlo ke zviditelnění separovaných proteinů. K tomuto účelu se používají různé typy barviv. Jako příklad lze uvést fluorescenční barvivo ethidium bromid, které interaguje s fragmenty na gelu a umožní jejich vizualizaci pod UV zářením (Hromadová 2014). Dalším příkladem je barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue (CBB) barviva, které zbarví gel na místech obsahujících proteiny modře. Jako třetí příklad lze uvést barvení stříbrným koloidem (Obr. 6), který se váže na cysteinové skupiny proteinů a oblasti s proteiny zbarví do šeda (*Creative Proteomics*).



Obr. 6 Dvourozměrná elektroforéza, barvení spotů stříbrem (Šeda a kol. 2006)

2.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, která slouží k identifikaci jednotlivých proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti (Šeda a kol. 2006). Je založena na interakci iontů molekul s magnetickým polem (Vaňková 1999). Původní proteiny jsou rozštěpeny na specifických místech na menší fragmenty (peptidy) (Kovářová a kol. 2005). Fragmenty molekul jsou nejprve ionizovány a následně rozděleny podle své hybnosti a energie (Vaňková 1999). Spektra získaná hmotnostní spektrometrií jsou porovnána s teoretickými spektry v databázích (Kovářová a kol. 2005).

Hmotnostní spektrometr se skládá z ionizačního zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru částic. Nejprve je třeba převést analyzované vzorky na ionty pomocí vhodné ionizační techniky (Dvořáková a kol. 2014). Jednou z ionizačních technik je elektronová ionizace, která je založena na předávání energie letících elektronů molekulám analytu. Dalším příkladem je ionizace elektrosprejem, kdy dochází k tvorbě nabitých kapiček (aerosolu) mobilní fáze s analyty. Odpařováním kapaliny dojde k uvolnění jednotlivých iontů. Třetím typem ionizační techniky je desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice (MALDI) (Friedecký a Lemr 2012). Jako matrice slouží organická kyselina, která pohlcuje energii záření laseru a dojde k jejímu zahřátí a desorpci (Dvořáková a kol. 2014). Ionizované vzorky přechází do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány na základě poměru

hmotnosti k náboji (m/z). Analyzátory se dají rozdělit do několika skupin. Jako první lze uvést skenující analyzátory, které kontinuálně vysílají k detektoru ionty o určitém m/z . Příkladem takového analyzátoru je kvadrupól. Dalším typem jsou analyzátory, kde dochází k separaci iontů podle rozdílné doby letu letovou trubicí, tzv. průletové analyzátory. Poslední skupina zahrnuje analyzátory, které zachycují ionty v cele, např. iontové pasti (Friedecký a Lemr 2012). Po separaci dopadají ionty na detektor, který srovnává počet iontů s hodnotami m/z . Výsledkem měření je hmotnostní spektrum (Dvořáková a kol. 2014).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zhodnotit, jaký vliv mají oxidy těžkých kovů ve formě nanočástic na huseníček rolní. Dílčími cíli bylo:

- sledovat změny v proteomu *Arabidopsis thaliana* po expozici CuO v nanoformě, standardní formě a CuSO₄ pomocí dvourozměrné elektroforézy,
- na základě výsledků odvodit míru toxicity nanočástic CuO v porovnání se standardní formou CuO a rozpustnou iontovou sloučeninou CuSO₄ (u které je toxicita očekávána),
- porovnat vliv těchto částic po jednodenním a čtyřdenním působení,
- určit, zda k dekontaminaci nanočástic z životního prostředí lze užít fytoremediační techniku.

4 PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE

4.1 Přístroje

Analytické váhy Ohaus AS 200 Analytical Standard
Analyzátor Gel Doc Ez Imager Bio-Rad
Centrifuga Hettich Universal 32R
Digestoř Flores Valles
Elektroforéza Power Pac 3000 Bio-Rad
Fokusátor Protean IEF Cell Bio-Rad
Kývačka Biosan Multi Bio 3D
Kývačka Labnet Revolver 360° Sample Mixer
Laboratorní váhy Ohaus AV413CN Adventure Pro RX
Laminární box Holten Laminair model 1.2
Magnetická míchačka Yellow Line MSH basic
Mrazák Sanyo V.I.P Series -86°C
Spektrofotometr TECAN Infinite M200
Sterilizátor Systec DB-23
Sterilizátor Tuttnauer 3850 EL
Světelný box Sanyo Verstile Environmental Test Chamber MLR-350T
Termotřepačka Biosan Thermo-Shaker TS 100C
Vortex Microspin FV 2400 Biosan
Výrobník ledu Brema Ice-Makers

4.2 Pomůcky

Alobal, automatické pipety, elektroforetická vana, Erlenmayerovy baňky, filtrační papír, fixy, gely (Criterion TGX Stain-Free, Bio-Rad), kádinky, kopistky, kultivační krabičky se sítky, ledová lázeň, lžičky, magnetická míchadla, mikrotitrační desky, mikrozukavky Eppendorf, nůžky, nádoba na tekutý dusík, odměrné válce, pinzety, plastové zkumavky s uzávěrem, stojan na zkumavky, stripy (11 cm, pH 5-8, Bio-Rad), stříčky, špičky, třecí miska s těrkou, váženky.

4.3 Chemikálie

2-merkaptoethanol (ME)

3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonát (CHAPS)

Aceton

Agar

Agaróza

Bradfordové činidlo

Bromfenolová modř

Dithiotreitol (DTT)

Dodecylsírán sodný (SDS)

Ethanol 70%

Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)

Glycerol 100%

Glycin

Hydroxid sodný

Jodacetamid

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

Kyselina trichloroctová (TCA)

Minerální olej

Močovina

Sacharóza

Savo 10%

Tekutý dusík

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Tris hydrochlorid

Ultračistá voda

Zásobní roztoky pro přípravu kultivačního média (tab. 1)

5 METODIKA

5.1 Kultivace rostlin *in vitro*

Jedná se o pěstování rostlinných kultur v uměle vytvořených podmínkách. Lze kultivovat celé rostliny, rostlinná pletiva nebo jednotlivé buňky. Kultivace probíhá ve zcela sterilním prostředí, aby nedošlo ke kontaminaci jinými organismy. Je třeba regulovat dobu a intenzitu osvětlení a teplotu prostředí. Dostupnost živin je zajištěna správným složením kultivačního média. Média se dělí na pevná a tekutá, která se navzájem liší přidávkem agaru. Tento polysacharid rostliny nedovedou štěpit, slouží ke zpevnění tuhého média a umožňuje snazší uchycení rostliny kořenovým systémem a její orientaci v prostoru. Vzhledem k rozdílným nárokům jednotlivých rostlinných druhů je třeba složení médií optimalizovat pro konkrétní rostlinný materiál. Každé médium obsahuje vodu, organickou a anorganickou složku. Anorganická složka představuje ionty důležité pro výživu rostlin. Ionty jsou obsaženy ve formě solí makroprvků (N, K, Ca, Mg, P, S) a mikroprvků (Cl, B, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni). Organická složka zahrnuje např. vitamíny a aminokyseliny. Média pro zelené fotosyntetizující rostliny musí obsahovat také cukry, nejčastěji ve formě sacharózy, pro zajištění energetických potřeb. Optimální hodnota pH se pohybuje kolem 5,8 (Skala 2011).

5.1.1 Příprava média

Murashige a Skoog definovali v roce 1962 základní složení kultivačního média (MS médium) (Murashige a Skoog 1962), které lze dalšími úpravami obsahu optimalizovat pro požadavky jednotlivých rostlinných kultur. Medium pro *Arabidopsis* se od základního MS média liší složením zásobního roztoku F a obsahem vitaminů. Důležitá je úprava pH média na 5,7-5,8 přidávkem HCl nebo NaOH.

Tuhé medium bylo připraveno smícháním zásobních roztoků A-F a ostatních složek (tab. 1) včetně agaru a zahřátím k varu. Poté bylo ještě teplé rozlito do připravených sklenic do výšky přibližně jednoho centimetru. Sklenice byly uzavřeny víčkem a sterilizovány v autoklávu. Do vychladlých sterilních sklenic s médiem byla vyseta semena *Arabidopsis thaliana*. Tekuté médium se liší od tuhého pouze tím, že neobsahuje agar, proto nebylo třeba jej zahřívát. Rovnou bylo přelito do Erlenmeyerových baněk. Hrdla baněk byla překryta hliníkovou fólií a stejně jako

v předchozím případě pevného média byly baňky sterilizovány v autoklávu. Tekuté médium bylo využito do krabiček pro kultivaci vytríděných rostlin a k následnému ovlivňování nanočásticemi kovů.

Tab. 1 Složení MS média pro *Arabidopsis thaliana* (Seidlová 2013)

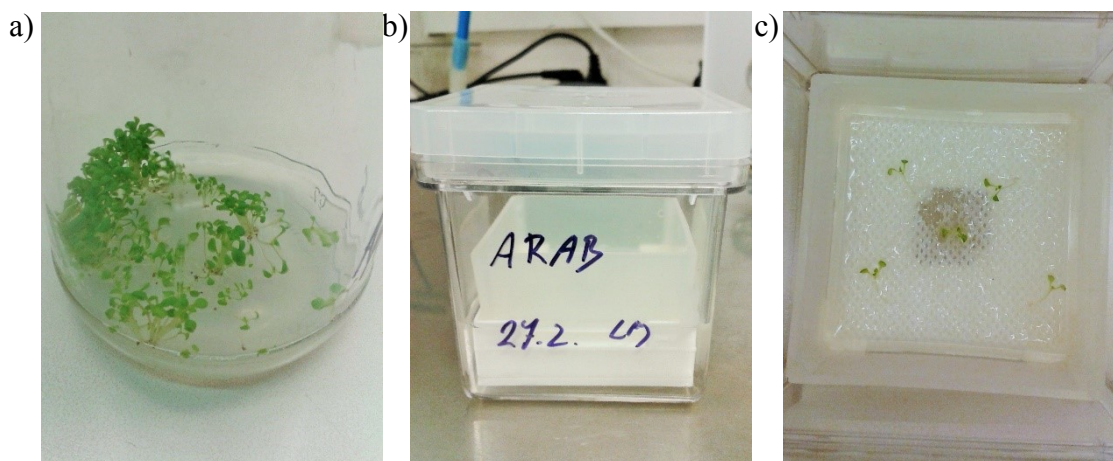
zásobní roztok (ZR)	složení ZR	množství sl. v 1 l ZR	množství ZR v 1 l média	koncentrace
A	NH ₄ NO ₃	82,5 g	20 ml	1650 mg/l
B	KNO ₃	95 g	20 ml	1900 mg/l
C	KH ₂ PO ₄	34 g	5 ml	170 mg/l
	H ₃ BO ₃	1,24 g		6,2 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50 mg		250 µg/l
	CaCl ₂ .6H ₂ O	5 mg		25 µg/l
	KI	166 mg		830 µg/l
D	CaCl 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
		ve 100ml ZR	ve 100ml média	
vitaminy	myoinositol	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
		v 1 l média		
agar	(tuhé médium)		8 g	
sacharóza			30 g	

5.1.2 Sterilizace semen a výsev

Semena bylo nutné před výsevem sterilizovat. Přiměřené množství semen bylo dvě minuty intenzivně protřepáváno v mikrozkuhavce s 1 ml 70% ethanolu. Ethanol byl opatrně odpipetován, byl přidán 1 ml 10% roztoku Sava a opět se protřepávalo deset minut. Dále bylo třeba pracovat sterilně v laminárním boxu. Roztok Sava byl odpipetován sterilní špičkou a semena třikrát promyta sterilní vodou. Nakonec byla semena s trochou sterilní vody rozpipetována do sklenic na tuhé médium. Sklenice se semeny byly kultivovány při 20 °C v kultivačním boxu s režimem 8 h světla a 16 h tmy. Klíčení trvalo přibližně deset dnů.

5.1.3 Přesazování

Po naklíčení byly rostliny vytříděny a přesazeny. Byly přesazovány po pěti do krabiček s tekutým médiem opatřených plovákem a sítkem (obr. 7). Opět bylo nutné pracovat ve sterilním prostředí laminárního boxu. Kultivace probíhala za stejných podmínek jako klíčení asi čtyřicet dnů.



Obr. 7 Přesazování *Arabidopsis thaliana* – a) naklíčené rostliny připravené k přesazování, b) kultivační krabička s plovákem, sítkem a tekutým médiem, c) sítko s rozsazenými rostlinami

5.2 Ovlivnění rostlin částicemi kovu

Rostliny byly ovlivňovány různým typem částic mědi, konkrétně síranem měďnatým („sůl“) a oxidem měďnatým ve standardní formě („bulk“) a v nanoformě („nano“). Celý postup probíhal v laminárním boxu. Práškové formy částic byly rozpuštěny ve sterilní vodě a rozpipetovány do nových sterilních krabiček s 50 ml tekutého média tak, aby výsledná koncentrace mědi v médiu dosáhla 100 mg/l. Vždy jedna krabička obsahovala jen čisté médium („kontrola“). Každý typ včetně kontrolního vzorku byl připraven třikrát ve dvou sadách. Do krabiček s takto ošetřeným médiem bylo přeneseno sítko s narostlými rostlinami. Jedna sada byla kultivována za stejných podmínek jako doposud jeden den a druhá sada čtyři dny.

5.3 Zpracování vzorků

Po celou dobu manipulace se vzorky bylo nutné pracovat výhradně v rukavicích, aby se zabránilo působení proteolytických enzymů lidské pokožky. Činnost enzymů by mohla narušit původní složení rostlinného proteomu. Vzorky byly mezi jednotlivými fázemi zpracovávání vždy uchovávány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

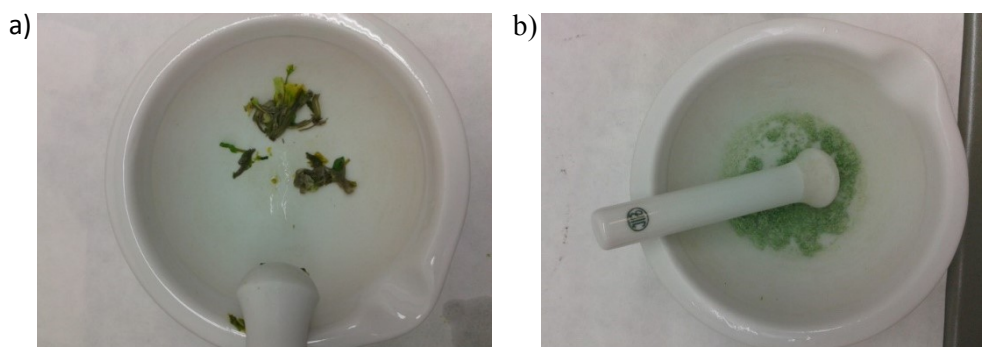
Ovlivněné rostliny bylo třeba sklízet a rozdělit na jednotlivé vzorky, které byly dále zpracovány (obr. 8). V první řadě byla nůžkami oddělena kořenová a listová část. Rostlinný materiál byl rozdělen na vzorky o přibližné hmotnosti 0,5-1,0 g. V případě kořenů bylo materiálu velmi málo, proto byly vytvořeny vzorky o 0,1-0,3 g. Vzorky byly jednotlivě zabaleny do hliníkové fólie, označeny a uchovávány až do zpracování v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 8 Ovlivněné rostliny připravené ke sklizni – zleva nahoře: nanočástice, bulk, dole: sůl, kontrola

5.3.1 Homogenizace

Všechny zmrazené vzorky byly homogenizovány v tekutém dusíku v porcelánové třence s těrkou. Rostlinný materiál o hmotnosti 0,5-1,0 g byl pomocí tekutého dusíku hluboce zmrazen, stal se křehkým a bylo tak umožněno jeho rozdrcení (obr. 9). Třecí misku bylo možné podložit polystyrenovou deskou, aby byl izolován její kontakt s pracovním stolem a teplota uvnitř byla co nejnižší. Nať i kořeny bylo nutné rozetřít co nejjemněji, aby následující extrakce proteinů byla co nejefektivnější. Zhomogenizovaný materiál byl ihned přenesen do plastových zkumavek o objemu 15 ml a uchováván v ledové lázni.



Obr. 9 Homogenizace – a) zmražený vzorek na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, b) částečně zhomogenizovaný vzorek

5.3.2 Extrakce proteinů

Připravené roztoky (tab. 2) byly uloženy v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ke zhomogenizovanému materiálu v plastové zkumavce bylo přidáno 10 ml roztoku A a obsah byl protřepán. Zkumavky byly uloženy za občasného protřepávání v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na jednu hodinu. Po vymrazení byla suspenze rozpipetována po 1,5 ml do mikrozskumavek uložených v ledové lázni a zcentrifugována při nastavení 10 min/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ /14000 rpm.

Supernatant byl slit a do mikrozskumavek v ledové lázni byl přidán po 1,5 ml roztok B. Obsah byl resuspendován pomocí špachtličky a vortexu a mikrozskumavky opět uloženy na jednu hodinu do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vymrazení byly vzorky zcentrifugovány při stejném nastavení, supernatant slit a znovu byl přidán roztok B. Po resuspendaci byly mikrozskumavky bez vymrazení zcentrifugovány. Po posledním slití supernatantu byly vzorky vysušeny na vakuové odparce. Vysušený proteinový prášek byl zvážen na analytických vahách (tab. 3). Vzhledem k velmi malému množství kořenového materiálu byly vždy vzorky 1, 2 a 3 spojeny v jeden.

Tab. 2 Složení roztoků pro extrakci proteinů

	složení	množství složky
roztok A	TCA	20 g
	2-merkaptoethanol	140 μl
	aceton	200 ml
roztok B	2mM EDTA	0,2340 g
	1mM PMSF	0,0700 g
	2-merkaptoethanol	280 μl
	aceton	do 400 ml

Tab. 3 Hmotnost proteinového prášku – K (kontrola), B (bulk), N (nano), S (sůl)

jedenodenní stres				čtyřdenní stres			
listy		kořeny		listy		kořeny	
vzorek	m [mg]	vzorek	m [mg]	vzorek	m [mg]	vzorek	m [mg]
K 1	21,0	K	14,9	K 1	13,8	K	27,7
K 2	14,0			K 2	55,9		
K 3	12,3			K 3	10,8		
B 1	8,4	B	13,5	B 1	31,9	B	32,8
B 2	18,7			B 2	26,2		
B 3	4,9			B 3	41,3		
N 1	8,4	N	20,8	N 1	27,9	N	40,3
N 2	5,5			N 2	29,8		
N 3	6,6			N 3	14,2		
S 1	13,4	S	11,7	S 1	25,5	S	11,1
S 2	27,4			S 2	19,3		
S 3	12,7			S 3	22,6		

5.3.3 Solubilizace proteinů

K proteinovému prášku v mikrozkuvkách bylo přidáno na každý 1 mg 50 μ l solubilizačního pufru (Tab. 4). Mikrozkuvky byly zahřívány na termotřepače při 37 °C jednu hodinu za občasného promíchání. Poté byly zcentrifugovány při nastavení 15 min/20 °C/14000 rpm. Supernatant byl slit do čisté mikrozkuvky a znovu zcentrifugován. Tento proces se opakoval, dokud nebyl supernatant čistý.

Tab. 4 Složení solubilizačního pufru

složení	množství složky
močovina	27 g
CHAPS	1 g
DTT	0,4630 g
voda	do 50 ml
amfolyty ^a	500 μ l

^aamfolyty – ve své molekule obsahují kyselé i zásadité skupiny, avšak navenek se jeví jako neutrální

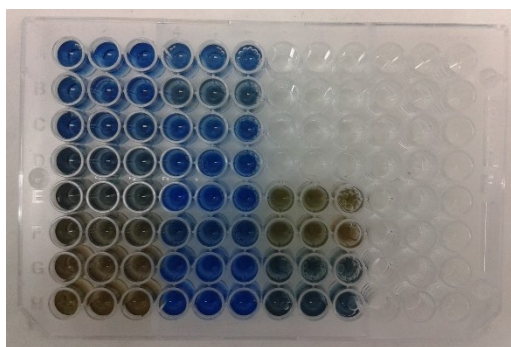
5.3.4 Měření koncentrace proteinů

Pro zjištění koncentrace proteinů v roztoku byla využita metoda dle Bradfordové. Na mikrotitrační desku bylo do každé jamky napipetováno Bradfordové činidlo po 250 μ l. V prvních třech sloupcích byla vytvořena koncentrační řada napipetováním vždy 5 μ l standardů hovězího sérového albuminu třikrát od každé koncentrace (0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml,

2 mg/ml). Pro nulovou koncentraci bylo použito 5 μ solubilizačního pufru. Poté bylo připipetováno třikrát po 5 μ l od každého vzorku.

S mikrotitrační deskou bylo jemně zatřepáno, aby se obsah jamek promíchal. Čím byla koncentrace proteinů vyšší, tím bylo modré zbarvení směsi v jamce intenzivnější (obr. 10). Vizuálně bylo zhodnoceno, zda se koncentrace proteinů vzorků pohybuje v rozmezí koncentrační řady standardů. Pokud se modré zbarvení zdálo příliš intenzivní, byly vzorky 2-4krát zředěny solubilizačním pufrům. Ředění bylo poté zohledněno při dopočítání koncentrací z kalibrační křivky.

Po pěti minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Z hodnot absorbancí standardů byla sestavena kalibrační přímka a dle rovnice přímky byla dopočítána koncentrace proteinů jednotlivých vzorků.



Obr. 10 Měření koncentrace proteinů pomocí Bradfordové činidla – vlevo koncentrační řada

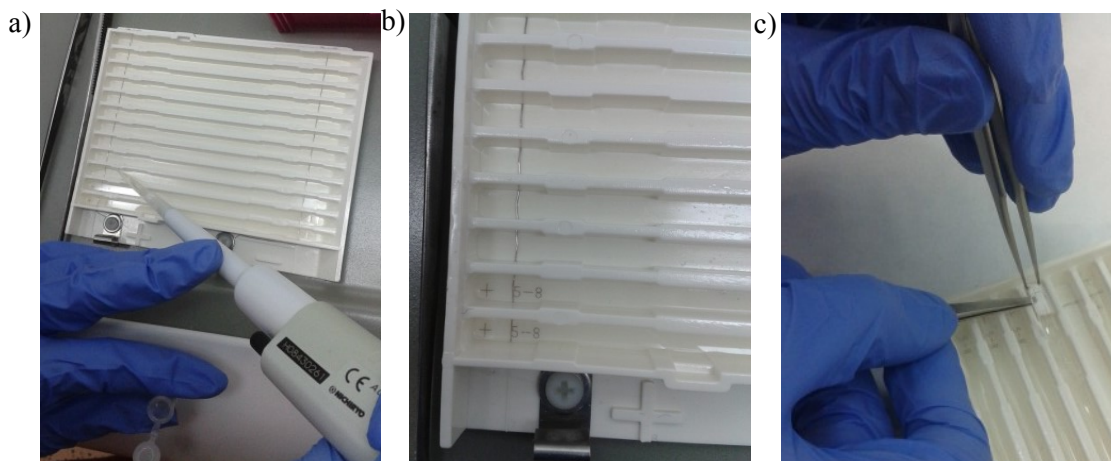
5.4 2D-elektororéza

5.4.1 Isoelektrická fokusace

Do žlábků fokusační destičky bylo nanášeno 200 μ l vzorku o koncentraci proteinů 800-1200 μ g/ml (obr. 11a). Koncentrace vzorků zjištěná metodou dle Bradfordové byla upravena pomocí solubilizačního pufru. Do každého žlábků byl uložen dle náboje strip o délce 11 cm s pH gradientem 5-8 gelem dolů (obr. 11b). Po patnácti minutách byly stripy převrstveny 1,5 ml minerálního oleje. Destička byla překryta víčkem a uložena do fokusátoru dle náboje elektrod. Byla spuštěna rehydratace.

Po patnácti hodinách byla rehydratace zastavena. Stripy byly v místě dotyku s elektrodami podloženy filtračními papírky napuštěnými 8 μ l ultračisté vody (obr. 11c). Poté byla spuštěna fokusace. Průběh fokusace lze rozdělit do několika fází. Celá

fokusace je provedena při teplotě 20°C. V první fázi je napětí nastaveno na 200 V. Během této fáze jsou odstraněny nadbytečné soli. V dalších fázích je napětí postupně zvyšováno. V druhé fázi je dosaženo 500 V, ve třetí je zvýšeno na 1000 V a ve čtvrté až na 8000 V. V závěru fokusace je napětí opět sníženo na 200 V a setrvává tak dlouho, dokud nejsou stripy vyjmuty. Tuto poslední fázi lze nazvat jako udržovací.



Obr. 11 Příprava stripů pro fokusaci – a) nanesení vzorku na fokusační destičku, b) umístění stripu dle náboje, c) podložení stripu filtračním papírkem

5.4.2 Ekvilibrace

Byl připraven zásobní ekvilibrační roztok a následně roztoky 1 a 2 v množství odpovídajícímu počtu stripů (tab. 5). Roztoky 1 a 2 byly uchovávány v lednici v tmavých uzavřených zkumavkách, aby bylo zabráněno přístupu světla. Po ukončení fokusace byly okapané stripy umístěny jednotlivě do tmavých zkumavek s roztokem 1 a ekvilibrovány deset minut na kývačce. Po deseti minutách byly stripy přeneseny do tmavých zkumavek s roztokem 2 a promývány opět deset minut na kývačce. Vždy bylo ekvilibrováno tolik stripů, kolik bylo možné ihned dále zpracovat.

Tab. 5 Složení roztoků pro ekvilibraci

	složení	množství složky (pro 1 strip)
ekvilibrační roztok	močovina	1,44 g
	1,5M Tris HCl (pH 8,8)	1 ml
	SDS	0,08 g
	glycerol (100%)	0,8 ml
	ultračistá voda	do 4 ml
roztok 1	DTT	0,04 g
	ekvilibrační roztok	2 ml
roztok 2	jodacetamid	0,05 g
	ekvilibrační roztok	2 ml

5.4.3 Elektroforéza

Byly připraveny dva litry elektroforetického pufru (tab. 6). Zakoupené gely byly vyjmuty z krabičky, opláchnuty deionizovanou vodou a zbaveny ochranné zabezpečovací pásky. Po okapání byly připraveny do stojánku. Na místo určené pro standardy byl umístěn filtrační papírek napuštěný 5 μ l standardu. Do žlábků určeného pro strip byla napipetována 0,8% agaróza v elektroforetickém pufru obarvená bromfenolovou modří. Agaróza byla předem zahřívána za stálého míchání do rozpuštění. Každý strip byl ihned po ukončení ekvilibrace promyt v elektroforetickém pufru a ponořen do žlábků s agarózou. Kolem stripu nesměly vzniknout bubliny (obr. 12a).

Po deseti minutách, kdy agaróza ztuhla, bylo možné gel umístit do elektroforetické vany. Vana byla naplněna elektroforetickým pufrem po značku a byla spuštěna elektroforéza (200 V, 30 mA). Byl pozorován modrý pruh čela elektroforézy, dokud neprostoupil celým gelem (obr. 12b).

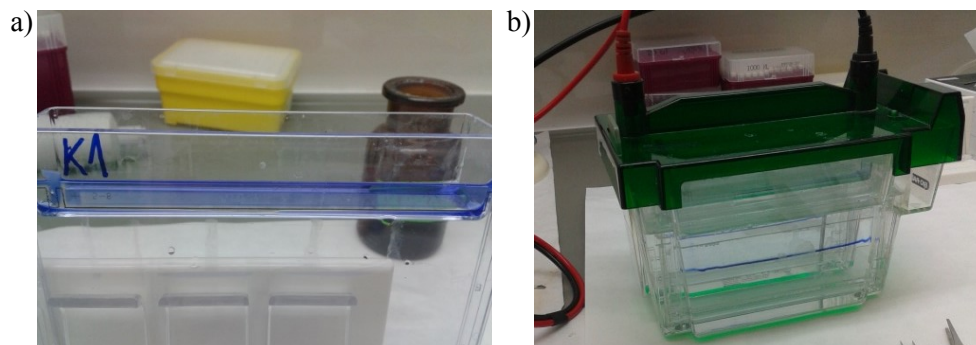
Po ukončení elektroforézy byly gely opatrně vyjmuty z plastového obalu, umístěny na skenovací desku pro „stain free“ a naskenovány do datové podoby. Poté byly ponořeny do Coomassie barviva (tab. 7) a barveny přibližně šest hodin. Po šesti hodinách byly přeneseny do ultračisté vody a za průběžného vyměňování vody odbarveny. Odbarvené gely byly opět naskenovány do datové podoby pomocí desky pro „Coomassie“ (obr. 13).

Tab. 6 Složení elektroforetického pufru

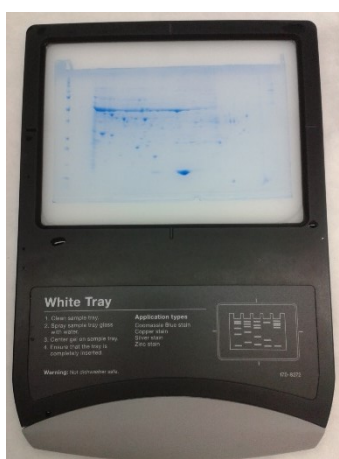
složení	množství složky
0,025M TRIS	6,057 g
0,192M glycin	28,827 g
0,1% SDS	2 g
ultračistá voda	do 2 l

Tab. 7 Složení Coomassie Brilliant Blue (CBB)

složení	množství složky
kyselina o-fosforečná	16 ml
destilovaná voda	768 ml
síran amonný	80 g
5% roztok CBB v destil. vodě	16 ml
methanol	200 ml



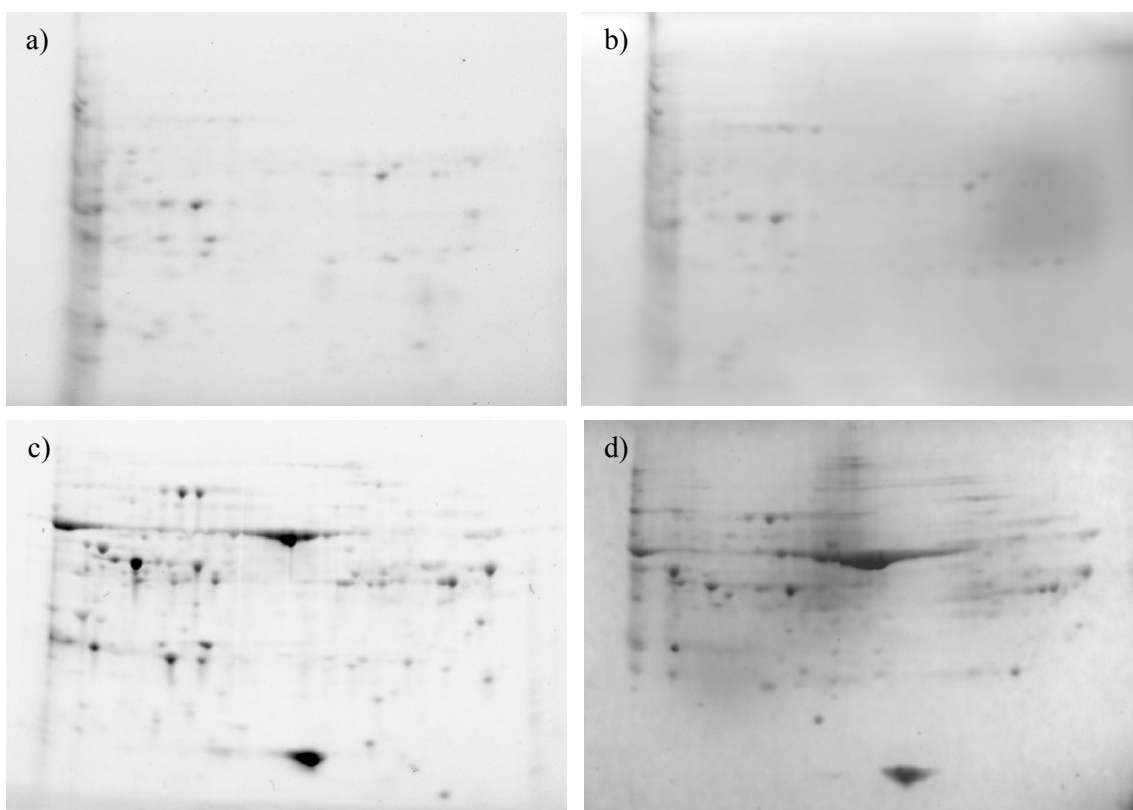
Obr. 12 Elektroforéza – a) strip a standard zalitý agarózou, b) čelo elektroforézy



Obr. 13 Gel po odbarvení na skenovací desce

6 VÝSLEDKY

Rostliny *Arabidopsis thaliana* byly vystaveny působení různých typů částic mědi. Bylo testováno, jakým způsobem ovlivní rostlinný proteom. Rostliny byly inkubovány s různými formami mědi nejprve jeden a poté čtyři dny. Z biologického materiálu byly izolovány proteiny a provedena elektroforéza. Hodnoceny byly proteiny listů na neobarvených „stain free“ gelech. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru PDQuest. Softwarem byla porovnána intenzita spotů charakterizujících jednotlivé proteiny oproti kontrolnímu vzorku. Na obr. 14 jsou ukázky naskenovaných gelů připravených pro hodnocení softwarem.

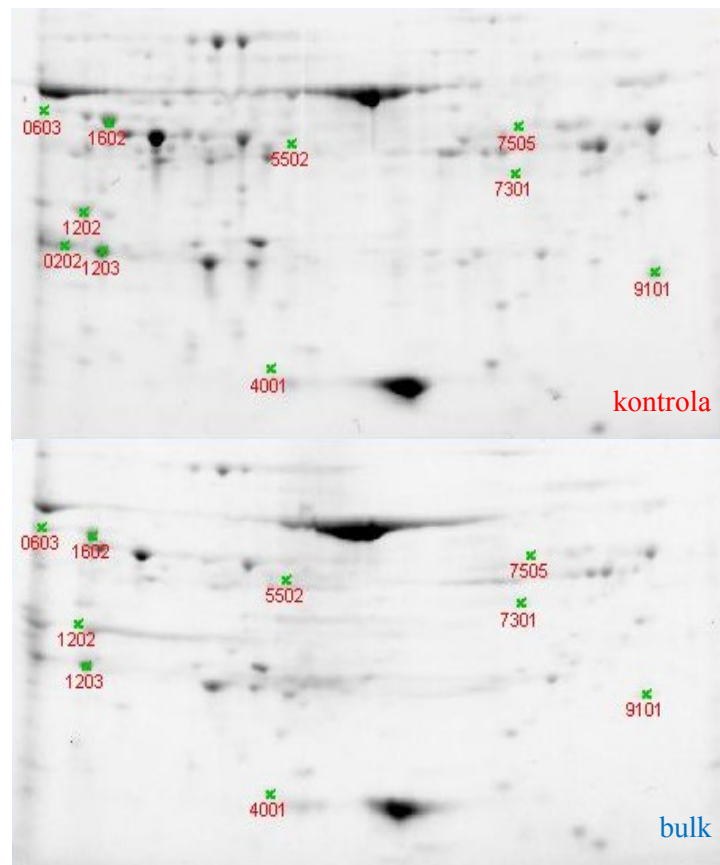


Obr. 14 Proteom *Arabidopsis thaliana* – a) stain free gel s proteomem kořene, b) gel s proteomem kořene obarvený Coomassie barvivem, c) stain free gel s proteomem listu, d) gel s proteomem listu obarvený Coomassie barvivem

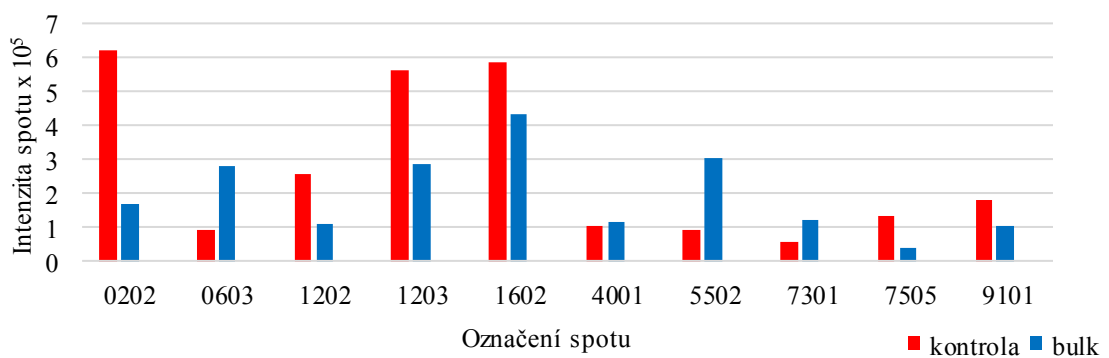
6.1 Jednodenní inkubace

6.1.1 Vliv oxidu měďnatého ve standardní formě – „bulk“

Při porovnání spotů u listů vystavených působení standardních částic oxidu měďnatého proti kontrole bylo nalezeno deset rozdílů (obr. 15). U čtyř spotů došlo ke zvýšení intenzity a u šesti ke snížení (obr. 16).



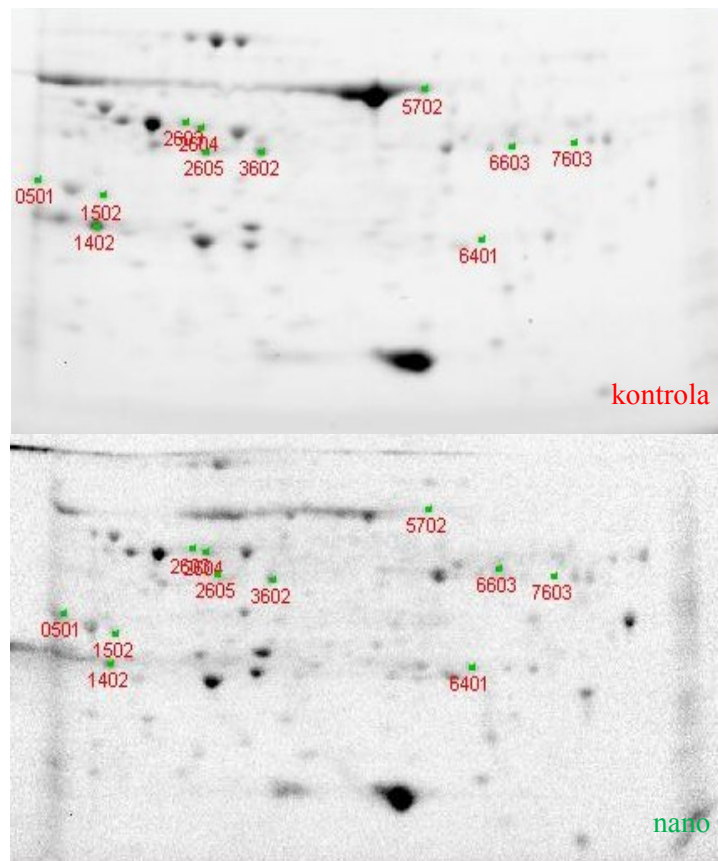
Obr. 15 Porovnání proteomu po jednodenním působení oxidu měďnatého ve standardní formě proti kontrolnímu vzorku



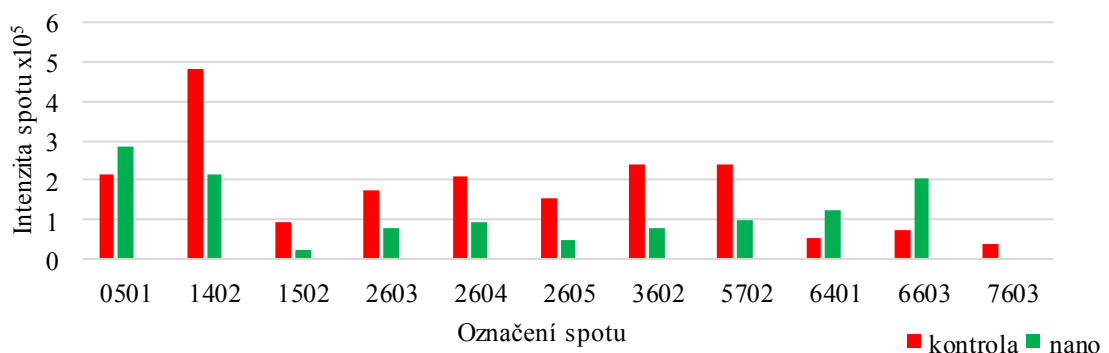
Obr. 16 Porovnání intenzity spotů po jednodenním působení oxidu měďnatého ve standardní formě proti kontrolnímu vzorku

6.1.2 Vliv oxidu měďnatého v nanoformě – „nano“

Porovnáním spotů u listů ovlivněných oxidem měďnatým v nanoformě proti kontrole bylo nalezeno jedenáct rozdílů (obr. 17). V osmi případech byla intenzita spotu oproti kontrole snížena a ve třech případech zvýšena (obr. 18).



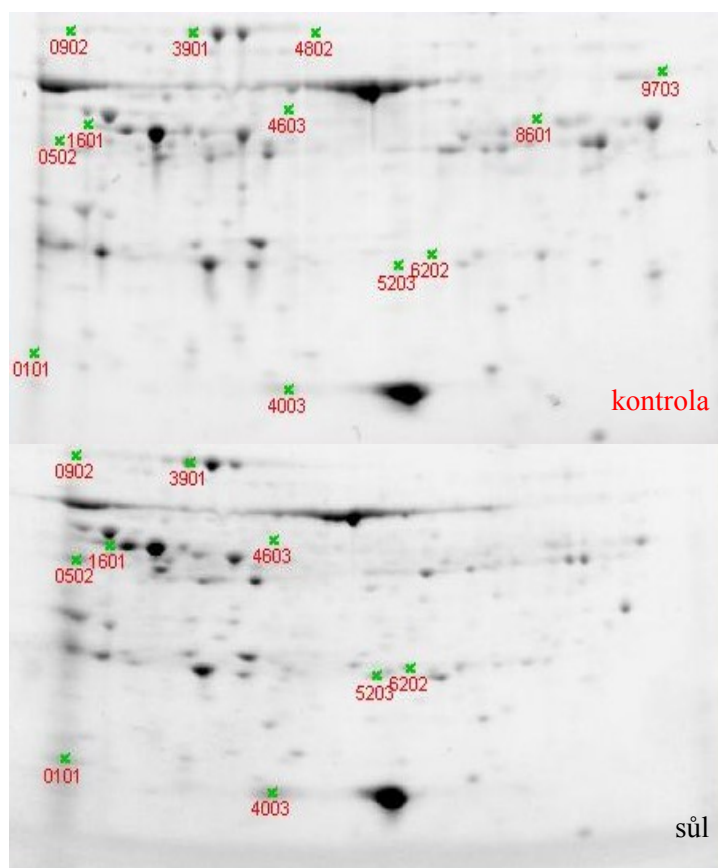
Obr. 17 Porovnání proteomu po jednodenním působení oxidu měďnatého v nanoformě proti kontrolnímu vzorku



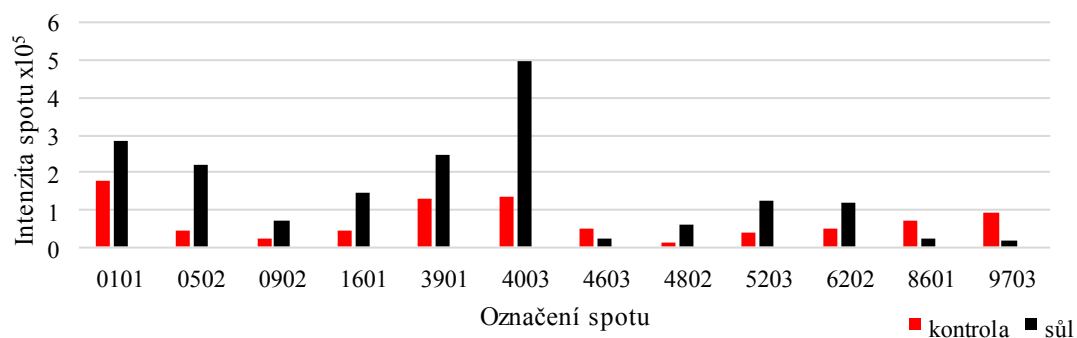
Obr. 18 Porovnání intenzity spotů po jednodenním působení oxidu měďnatého v nanoformě proti kontrolnímu vzorku

6.1.3 Vliv síranu měďnatého – „sůl“

Spoty proteinů z listů ovlivněných síranem měďnatým se oproti kontrole lišily ve dvanácti případech (obr. 19). V devíti případech byla intenzita spotu oproti kontrole zvýšena a ve třech případech snížena (obr. 20).



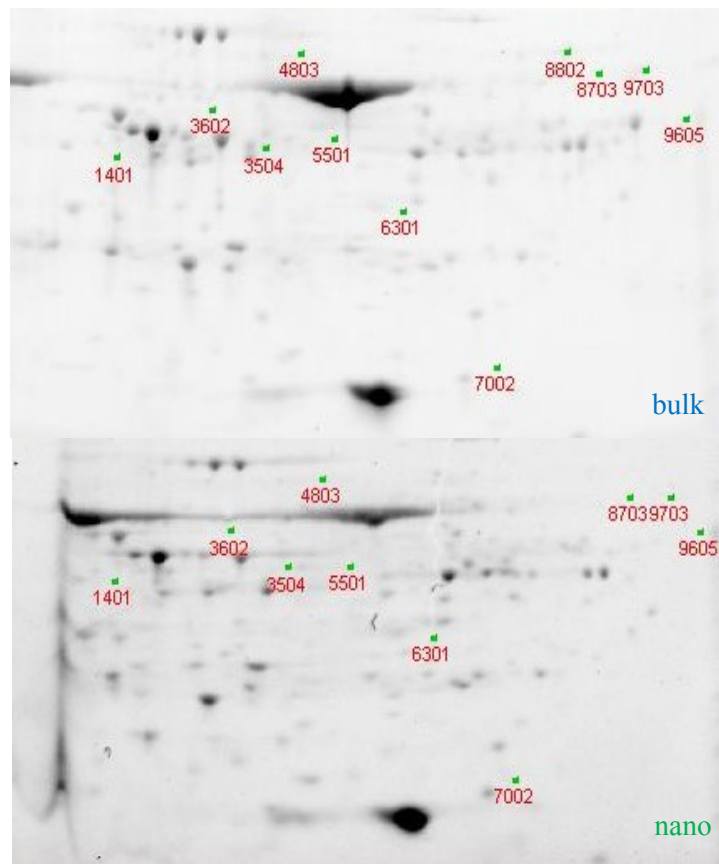
Obr. 19 Porovnání proteomu po jednodenním působení síranu měďnatého proti kontrolnímu vzorku



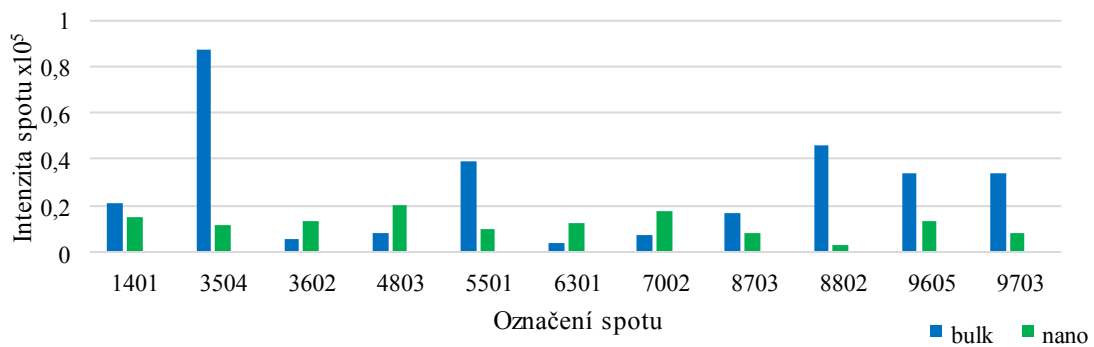
Obr. 20 Porovnání intenzity spotů po jednodenním působení síranu měďnatého proti kontrolnímu vzorku

6.1.4 Porovnání vlivu oxidu měďnatého ve standardní a nanoformě

Při porovnání standardní a nanoformy oxidu měďnatého byly nalezeny rozdíly u jedenácti spotů (obr. 21). Intenzita spotů u listů ovlivněných nanoformou byla snížena v sedmi případech, ve čtyřech případech byla naopak zvýšena (obr. 22).



Obr. 21 Porovnání proteomu po jednodenním působení oxidu měďnatého ve standardní a nanoformě

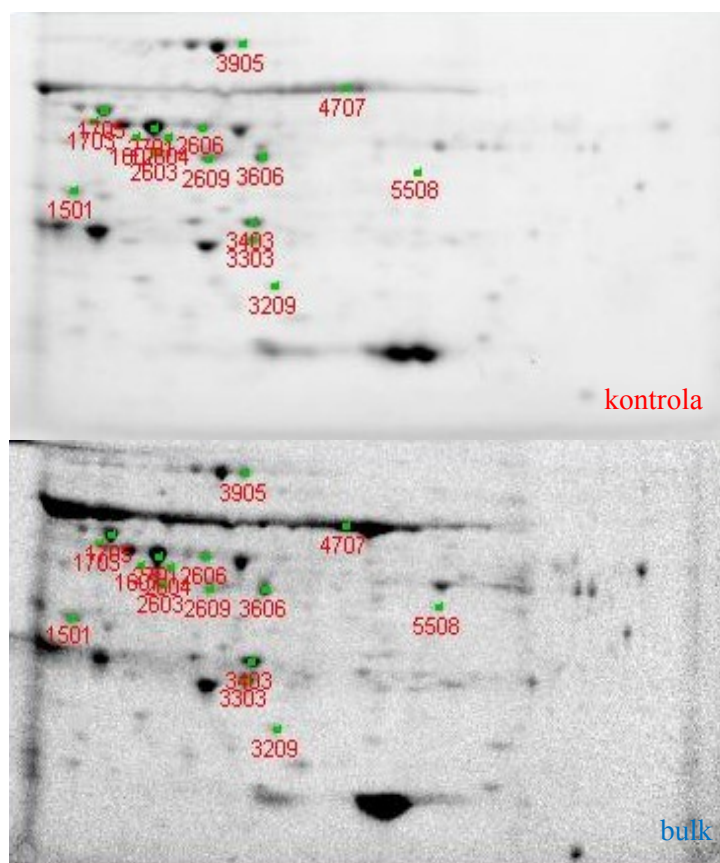


Obr. 22 Porovnání intenzity spotů po jednodenním působení oxidu měďnatého ve standardní a nanoformě

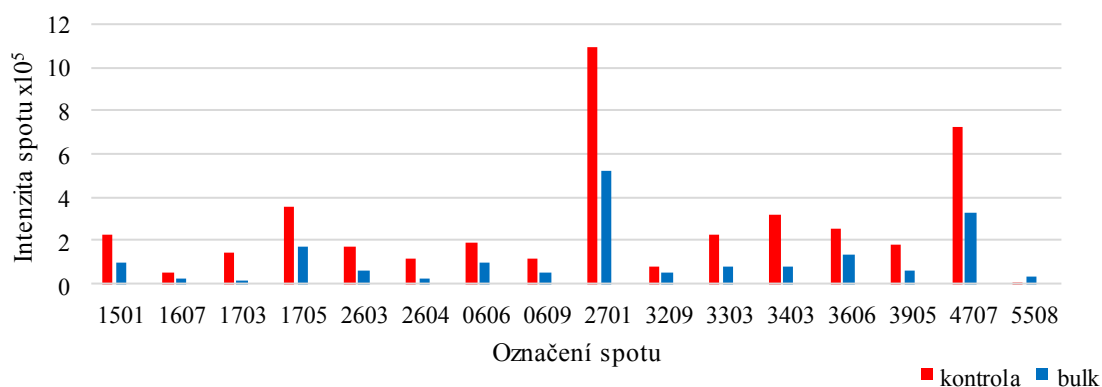
6.2 Čtyřdenní inkubace

6.2.1 Vliv oxidu měďnatého ve standardní formě – „bulk“

Porovnáním proteinové mapy ovlivněné oxidem měďnatým ve standardní formě s kontrolní bylo nalezeno šestnáct rozdílů (obr. 23). Ke snížení intenzity došlo u patnácti spotů, pouze v jednom případě byla intenzita zvýšena (obr. 24).



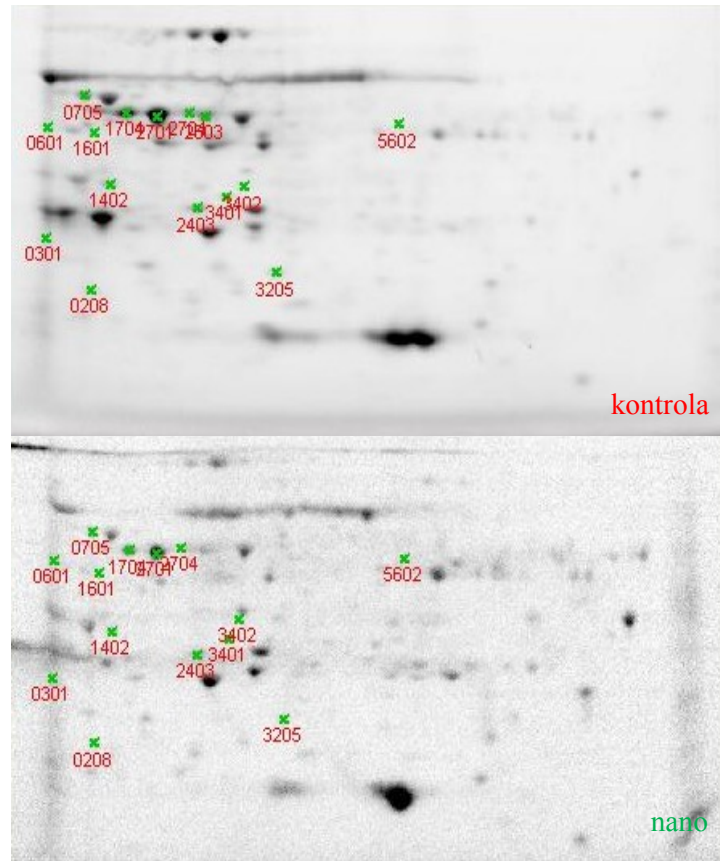
Obr. 23 Porovnání proteomu po čtyřdenním působení oxidu měďnatého ve standardní formě proti kontrolnímu vzorku



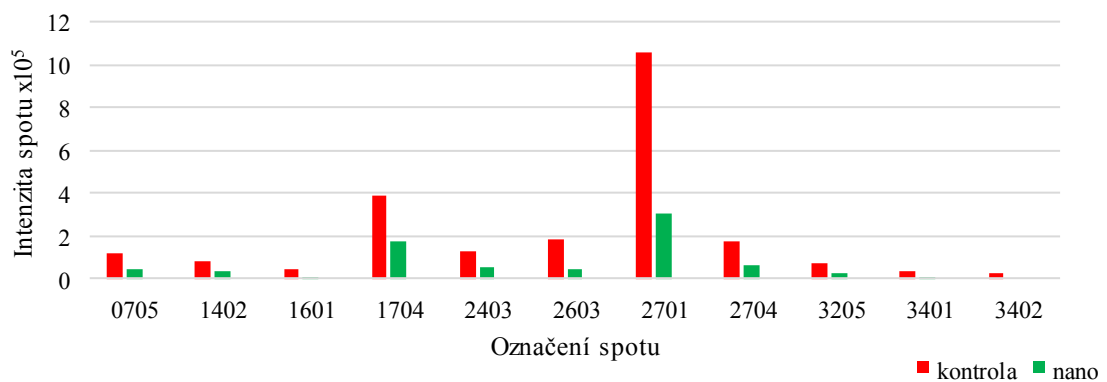
Obr. 24 Porovnání intenzity spotů po čtyřdenním působení oxidu měďnatého ve standardní formě proti kontrolnímu vzorku

6.2.2 Vliv oxidu měďnatého v nanoformě – „nano“

Při porovnání spotů proteinů z listů ovlivněných oxidem měďnatým v nanoformě proti kontrolnímu vzorku bylo nalezeno jedenáct rozdílů (obr. 25). Ve všech případech došlo ke snížení intenzity spotů oproti kontrole (obr. 26).



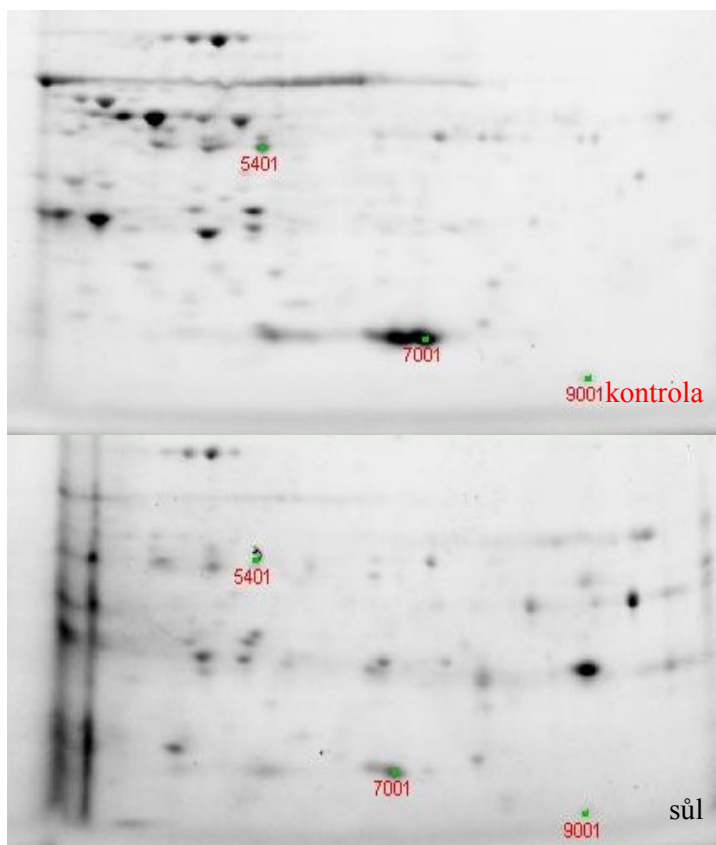
Obr. 25 Porovnání proteomu po čtyřdenním působení oxidu měďnatého v nanoformě proti kontrolnímu vzorku



Obr. 26 Porovnání intenzity spotů po čtyřdenním působení oxidu měďnatého v nanoformě proti kontrolnímu vzorku

6.2.3 Vliv síranu měďnatého – „sůl“

V případě ovlivnění listů síranem měďnatým byly nalezeny pouze tři rozdíly v porovnání s kontrolou, pravděpodobně z důvodu denaturace vzorku působením soli (obr. 27). Opět došlo ke snížení intenzity spotů ve všech případech (obr. 28).



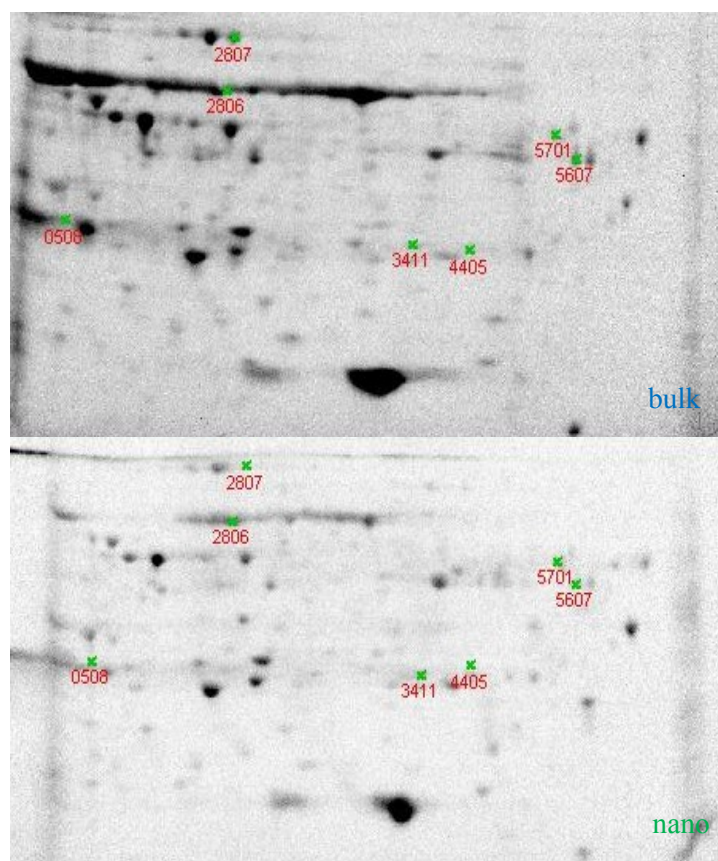
Obr. 27 Porovnání proteomu po čtyřdenním působení síranu měďnatého proti kontrolnímu vzorku



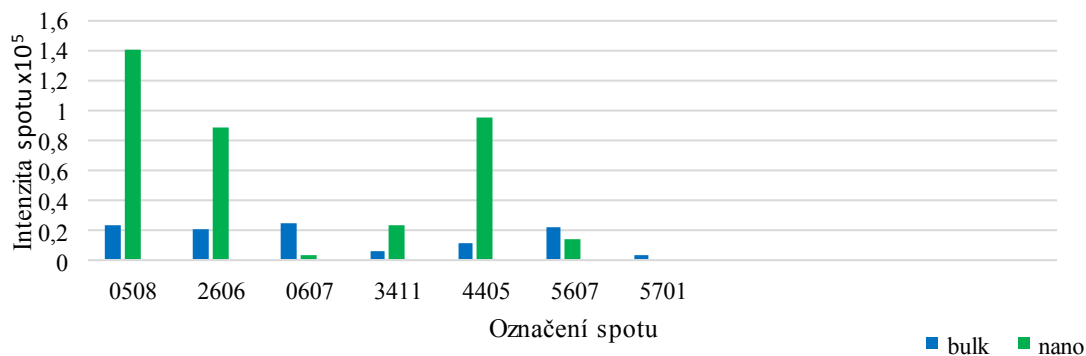
Obr. 28 Porovnání intenzity spotů po čtyřdenním působení síranu měďnatého proti kontrolnímu vzorku

6.2.4 Porovnání vlivu oxidu měďnatého ve standardní a nanoformě

Listy ovlivněné oxidem měďnatým ve standardní formě se oproti nanoformě lišily v sedmi spotech (obr. 29). Spoty proteinů ovlivněné nanoformou jsou ve čtyřech případech intenzivnější, ve třech případech naopak intenzita klesla (obr. 30).



Obr. 29 Porovnání proteomu po čtyřdenním působení oxidu měďnatého ve standardní a nanoformě

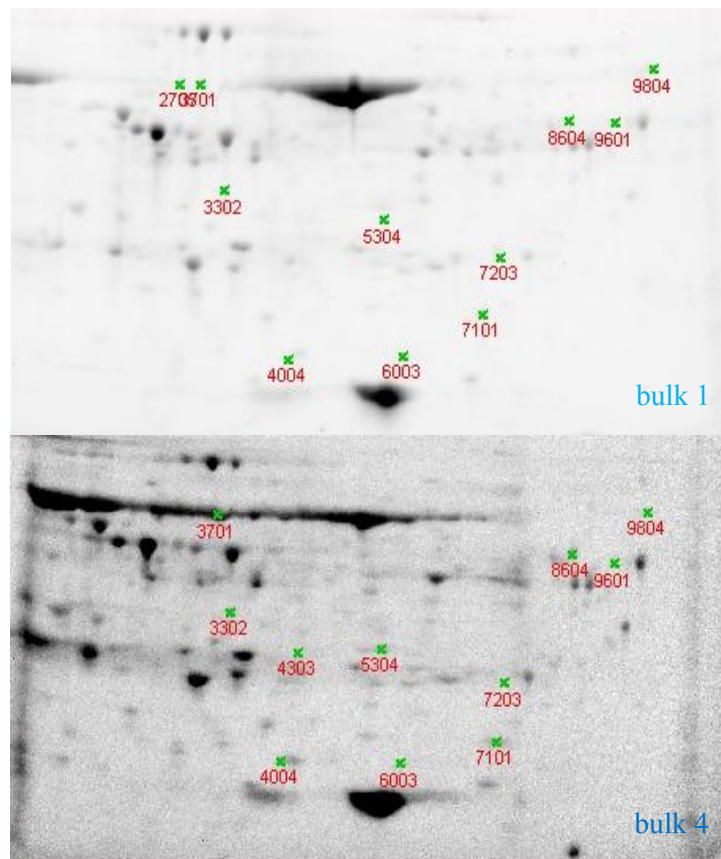


Obr. 30 Porovnání intenzity spotů po čtyřdenním působení oxidu měďnatého ve standardní a nanoformě

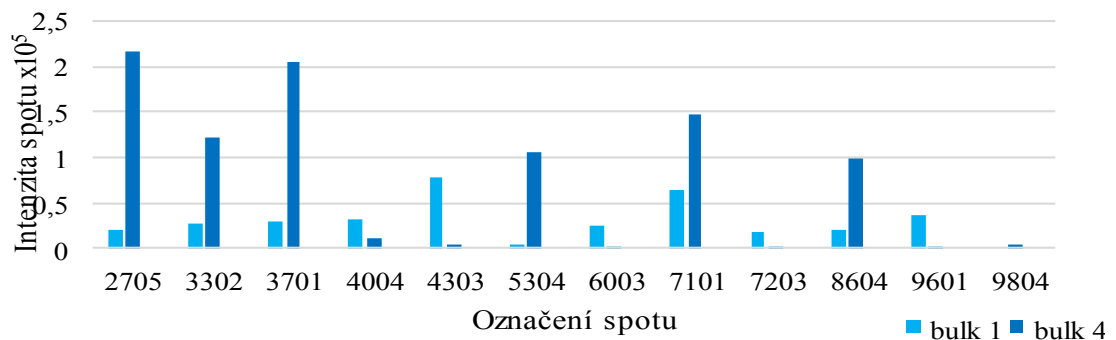
6.3 Porovnání jednodenní a čtyřdenní inkubace

6.3.1 Rozdíl jednodenního a čtyřdenního působení oxidu měďnatého ve standardní formě

Porovnáním proteomů bylo nalezeno dvanáct rozdílů (obr. 31). V sedmi případech došlo po delším ovlivňování ke zvýšení intenzity spotu, v pěti případech byla intenzita spotu nižší (obr. 32).



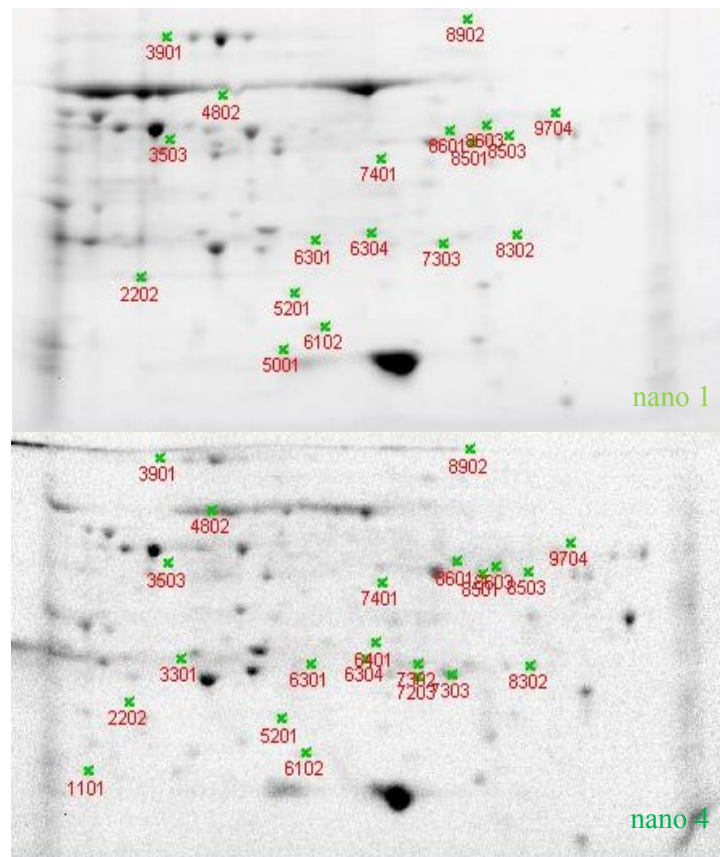
Obr. 31 Porovnání proteomu po jednodenním (bulk 1) a čtyřdenním (bulk 4) působení oxidu měďnatého ve standardní formě



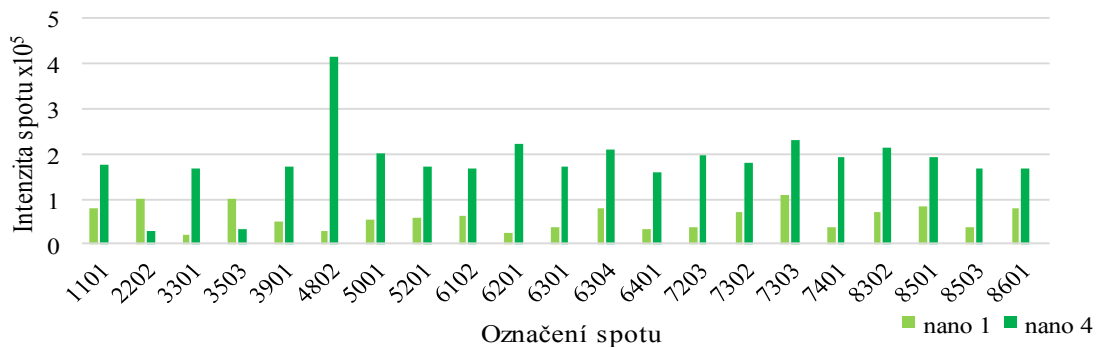
Obr. 32 Porovnání intenzity spotů po jednodenním (bulk 1) a čtyřdenním (bulk 4) působení oxidu měďnatého ve standardní formě

6.3.2 Rozdíl jednodenního a čtyřdenního působení oxidu měďnatého v nanoformě

V proteinových mapách bylo nalezeno dvacet jedna rozdílných spotů (obr. 33). V naprosté většině (devatenáct) spotů došlo při delším působení ke zvýšení intenzity, pouze u dvou byla intenzita snížena (obr. 34).



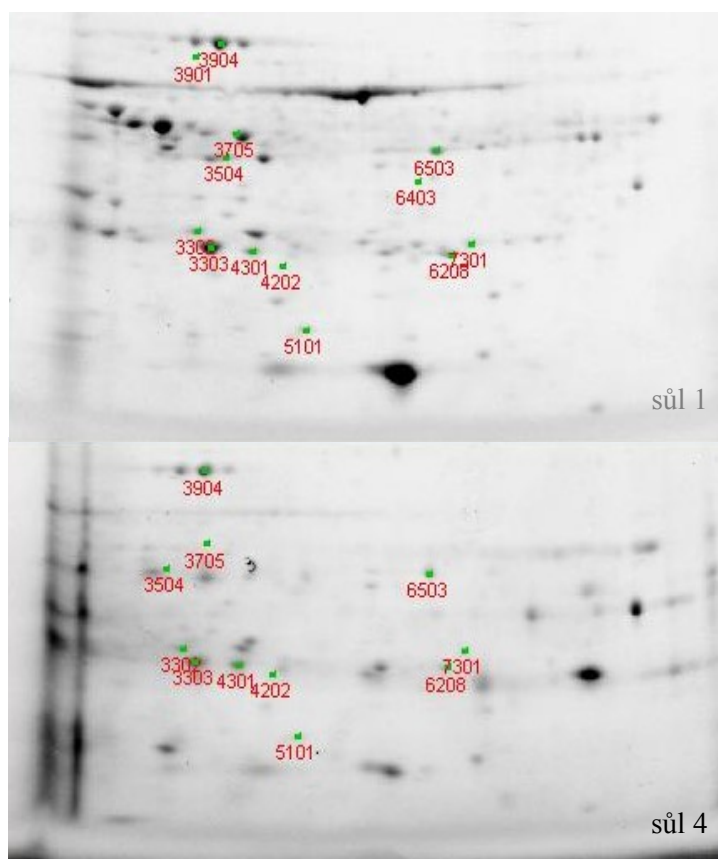
Obr. 33 Porovnání proteomu po jednodenním (nano 1) a čtyřdenním (nano 4) působení oxidu měďnatého v nanoformě



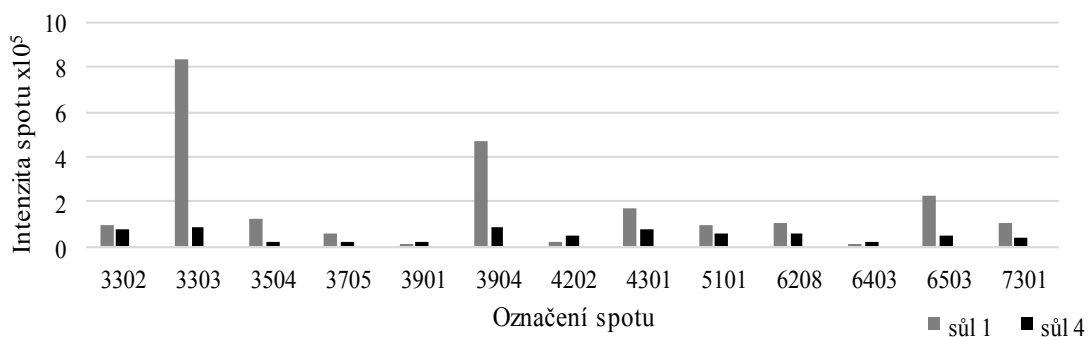
Obr. 34 Porovnání intenzity spotů po jednodenním (nano 1) a čtyřdenním (nano 4) působení oxidu měďnatého v nanoformě

6.3.3 Rozdíl jednodenního a čtyřdenního působení síranu měďnatého

Mezi proteomy bylo nalezeno třináct rozdílů (obr. 35). U deseti spotů došlo při delším ovlivnění ke snížení intenzity, u zbylých třech spotů byla naopak intenzita zvýšena (obr. 36).



Obr. 35 Porovnání proteomu po jednodenním (sůl 1) a čtyřdenním (sůl 4) působení síranu měďnatého



Obr. 36 Porovnání intenzity spotů po jednodenním (sůl 1) a čtyřdenním (sůl 4) působení síranu měďnatého

7 DISKUZE

Nanočástice se stávají velkým ekotoxikologickým problémem současnosti. Jako produkty mnoha procesů lidské činnosti se snadno ukládají v životním prostředí, odkud se dostávají do rostlinných organismů a následně potravním řetězcem i do organismů živočišných. Ukládání nanočástic v rostlinách je cíleně využíváno při fytoimediačních procesech. Otázkou zůstává, jakým způsobem nanočástice rostlinný organismus ovlivňují, zda jsou škodlivými, či prospěšnými.

V experimentech jsou rostliny vystavovány nejen nanomateriálům, ale pro porovnání také látkám běžné velikosti o stejném chemickém složení. Jen tak lze určit, jestli je vliv na rostliny dán specifickými vlastnostmi nanočástic nebo jejich chemickým složením. Byla potvrzena různorodost biologické odpovědi na nanomateriály (Cyrusová a kol. 2015).

V této práci bylo sledováno, jakým způsobem nanočástice ovlivňují proteom huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Pokusy byly provedeny i s jinými formami částic pro porovnání. Konkrétně byl porovnáván vliv částic oxidu měďnatého ve standardní formě a nanoformě a soli mědi v podobě síranu měďnatého. Zároveň byl sledován i časový vliv těchto částic na rostlinný proteom. Jednodenní působení částic můžeme označit jako akutní stres, čtyřdenní působení potom jako stres chronický (Zou a kol. 2014).

Pro zpracování vzorku bylo třeba alespoň 0,5 g rostlinného materiálu. Vzorky získané z listů tvořily až trojnásobek tohoto množství a nebyl problém z nich izolovat proteiny v dostatečné koncentraci pro elektroforézu. Kořenového materiálu bylo naopak velmi málo. Jeho množství se pohybovalo kolem 0,1-0,3 g. Vzhledem k tomu, že během zpracování vzorku docházelo ke ztrátám a výsledná koncentrace proteinů by nemusela být dostatečná, byly vždy kořenové vzorky 1, 2 a 3 spojeny v jeden. Ani tak nebylo dosaženo využitelných koncentrací. Elektroforéza kořenových vzorků byla přesto provedena, avšak software PDQuest nedokázal gely porovnat. Možná právě proto, že měď obecně brzdí růst kořenového systému (Stampoulis a kol. 2009), nebyl získán dostatek rostlinného materiálu.

Pro porovnání vlivu různých forem částic mědi byly použity pouze neobarvené „stain free“ gely, které byly analyzovány softwarem na základě fluorescenčního značení proteinových skvrn. Naproti tomu některé gely značené barvivem Coomassie Brilliant

Blue nebyly dostatečně obarveny a software nedokázal proteiny změřit. Nebylo tak možné provést kompletní porovnání všech sad vzorků.

Pro přežití rostlinných buněk je důležité zachovat funkční konformaci proteinů (Fišer a kol. 2014). Vzhledem k tomu, že se rostliny nepohybují a nemohou uniknout řadě stresujících faktorů, které mají dopad na stabilitu proteinů, vyvinuly se u nich složité obranné mechanismy (Sugio a kol. 2009). V případě, že rostlina pomocí receptorů rozpozná stresující faktor, je aktivována signální dráha, která vede k expresi proteinů vedoucích k obranné reakci (Dadáková 2015). Jako příklad lze uvést tvorbu „heat shock“ proteinů, které jsou schopny opravovat proteiny poškozené tepelným stresem. Při detoxikaci kovů a kovových iontů se uplatňují peptidy zvané fytochelatiny a metalothioneiny (Fišer a kol. 2014). Tvorba těchto obranných proteinů a biotransformačních enzymů se projeví na proteinové mapě jako zvýšení intenzity spotu. Pokud je stresový faktor příliš silný a obranné mechanismy nedovedou ochránit strukturu běžně se vyskytujících proteinů, dochází k jejich degradaci. Ta se naopak projeví na proteinové mapě snížením intenzity spotu. Vedle biotransformačních enzymů, stavebních proteinů a proteinů účastnících se obranné stresové reakce jsou v rostlině ovlivňovány i proteiny zodpovědné za energetický metabolismus, metabolismus sacharidů, fotosyntézu, degradaci RNA a transport xenobiotik (Zou a kol. 2014).

Porovnáním výsledků experimentu bylo zjištěno, jaké formy částic mědi v závislosti na čase jsou pro rostliny toxické a se kterými se dovedou do jisté míry vypořádat. Je-li rostlina schopná daný kontaminant ve svém organismu degradovat, aniž by byly narušeny její funkční proteiny, dalo by se uvažovat o užití rostliny při fytoremediaci.

Působení oxidu měďnatého v nanoformě („nano“). Většina literatury hodnotí vliv nanočástic CuO na kořenový systém. Například Tang a kol. (2016) sledoval vliv CuO nanočástic o koncentraci 20 mg/l u *Arabidopsis* a Wang a kol. (2015) použil koncentraci 5 mg/l u *Oryza sativa*. V obou případech byl pozorován výrazný průnik částic přes pokožku kořenů. Došlo k inhibici kořenového růstu, poškození kořenového systému a k tvorbě reaktivních forem kyslíku v důsledku oxidativního stresu. Byla zvýšena exprese proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres. Ze zmíněných výzkumů je patrné, že již malé koncentrace nanočástic působí na kořenový systém negativně. Atha a kol. (2012) uvádí, že toxicita nanočástic CuO je závislá na rostoucí koncentraci. Vzhledem k tomu, že tato práce sleduje možnost využití rostlin

při fytořmediaci nanočástic, byla použita koncentrace 100 mg/l, která je poměrně vysoká a lépe charakterizuje ukládání kontaminantů v rostlině během fytořmediálního procesu. Lze tedy předpokládat, že několikanásobně vyšší koncentrace nanočástic prohloubila negativitu účinku a došlo k redukci růstu kořenů. Skutečnost, že s rostoucí koncentrací CuO nanočástic roste jejich průnik do kořenů a poškození kořenového systému, zjistil i Deng a kol. (2016) u *Allium cepa*.

Nanočástice se kumulují v chloroplastech (Da Costa a kol. 2016) a v mitochondriích (Karlsson 2009). V chloroplastech *Oryza sativa* narušují membrány thylakoidů a působí snížení jejich počtu, dále snižují množství chlorofylu a celkově zpomalují fotosyntetické procesy (Da Costa a kol. 2016). Rieger a kol. (2015) pozoroval snížení chlorofylu vlivem CuO nanočástic u *Landoltia Punctata*. Zjistil i časovou závislost mezi působením částic a změnou ve fotosyntetickém systému. Tvrdí, že 24 hodin je příliš krátká doba na to, aby mohlo dojít ke snížení obsahu fotosyntetických pigmentů. Ani na vzorcích ovlivněných jednodenním působením měděných částic nebyla změna v obsahu chlorofylu patrná. Po čtyřdenním působení byla už ztráta pigmentu pozorovatelná pouhým okem. Na obr. 8 je vidět, že k největší ztrátě fotosyntetického barviva došlo u rostliny ovlivněné solí (vlevo dole), následuje rostlina ovlivněná nanočásticemi (vlevo nahoře), kde lze pozorovat mírné žloutnutí listů ve středu růžice. Na rostlině ovlivněné bulk formou CuO (vpravo nahoře), není ztráta zbarvení zřetelná. Jedním z klíčových mechanismů toxicity nanočástic může být jejich schopnost poškozovat mitochondrie a v důsledku toho narušovat energetický metabolismus (Karlsson 2009).

Další odpovědí na toxicitu nanočástic CuO je zpomalení klíčení a celkové snížení růstu a produkce biomasy (Da Costa a kol. 2016). Atha a kol. (2012) sledoval vliv nanočástic na poškození DNA. Bylo zjištěno, že způsobují oxidativní narušení bází DNA reaktivními formami kyslíku. Takto poškozená DNA vede ke genové nestabilitě, snižuje růst rostlin a zvyšuje riziko výskytu rostlinných onemocnění. Právě oxidativní stres je dle Regiera a kol. (2015) považován za hlavní mechanismus toxicity CuO nanočástic. Činnost enzymů účastnících se reakce rostlin na oxidativní stres se výrazně mění v průběhu času. Mezi tyto enzymy patří superoxid-dismutáza (SOD) a peroxidáza (POD). Množství těchto enzymů narůstá během akutní reakce rostlin na stres. Po čase se rostliny stresu částečně přizpůsobí a obrannou funkci přesunou na jiné enzymy. POD má v rostlině několik funkcí a její množství se neustále mění. Dojde-li však k oxidativnímu stresu, její množství výrazně stoupne (Regier a kol. 2015).

Po jednodenním působení oxidu měďnatého v nanoformě došlo v porovnání s kontrolním vzorkem ke snížení intenzity u osmi spotů, u třech spotů byla intenzita zvýšena (obr. 18). Zvýšení intenzity by se dalo zhodnotit jako reakce rostlinného organismu na akutní oxidativní stres. Spoty se sníženou intenzitou pravděpodobně charakterizují proteiny energetického metabolismu, jehož funkce je snížena díky poškozeným mitochondriím. Snížení fotosyntézy dle Riegera a kol. (2015) po jednodenním stresu nepřipadá v úvahu. Nízká intenzita spotů by mohla značit i nižší produkci biomasy oproti kontrolnímu vzorku.

Čtyřdenní působení nanoformy CuO způsobilo snížení intenzity u všech spotů (obr. 26). Stejně jako v předchozím případě lze usuzovat, že se jedná o proteiny narušeného energetického metabolismu a o proteiny stavební, jejichž úbytek souvisí se snížením produkce biomasy. Po delším vlivu částic pravděpodobně dochází i ke snížení fotosyntézy. Rostliny se již z větší části vyrovnaly s akutním stresem, proto nejsou patrné žádné spoty s výrazně zvýšenou intenzitou.

Na obr. 34 je znázorněn rozdíl mezi jednodenním a čtyřdenním působením nanočástic CuO. Pouze u dvou spotů došlo po čtyřdenním působení ke snížení intenzity. Tyto proteiny by nejspíše mohly souviset s fotosyntézou a její inhibicí v závislosti na čase. Ostatních devatenáct spotů má po delším působení intenzitu zvýšenou. Tuto skutečnost lze vysvětlit jako adaptaci rostlin na akutní oxidativní stres. Pravděpodobně se jedná o strukturální proteiny, které byly zpočátku vlivem akutního stresu degradovány. Během adaptace si rostliny znovu vytvořily degradované proteiny a jejich množství se znovu vyrovnalo kontrolním rostlinám. Proto nejsou tyto výrazné změny patrné na obr. 26.

Působení oxidu měďnatého ve standardní formě (bulk). Většina výzkumů užívá bulk formu pro porovnání účinku nanočástic. Bylo zjištěno, že biodostupnost nanočástic CuO je oproti bulk několikanásobně vyšší. Aruoja a kol. (2009) uvádí, že při použití stejné koncentrace bylo po 72 hodinách biologicky dostupno 25 % Cu z nanoformy CuO a pouze 0,18 % Cu z bulk CuO. To by mohlo vysvětlovat, proč není v žádné literatuře popsán toxický vliv konkrétně těchto částic na rostlinu. V porovnání s nanočásticemi se do rostlinného organismu téměř nedostanou. Lze logicky usuzovat, že pokud toxicita nanočástic roste s koncentrací, bude to podobné i u bulk formy. Tento vliv lze přisoudit spíše účinku mědi jako takové. Je-li měď v rostlině v nadbytku, může způsobit inhibici růstu kořenů i biomasy a snížení důležitých buněčných procesů, např. fotosyntézy. Při vysokých koncentracích může doházet k úbytku chlorofylu

a narušení thylakoidních membrán (Yruela 2005). Je zřejmé, že účinky mědi jsou totožné u všech forem částic, budou se lišit pouze svojí měrou.

Porovnáním proteomu ovlivněného jednodenním působením oxidu měďnatého ve standardní formě (bulk) s kontrolním bylo nalezeno sedm spotů, u kterých došlo vlivem bulk formy ke snížení intenzity, u čtyř spotů byla intenzita zvýšena (obr. 16). Zvýšení intenzity lze podobně jako u nanočástic přisoudit akutní reakci rostliny na nežádoucí podmínky. Stejně tak snížení intenzity odpovídá narušenému energetickému metabolismu a snížené produkci biomasy.

Čtyřdenní působení CuO ve standardní formě způsobilo snížení intenzity u patnácti spotů v porovnání s kontrolním vzorkem (obr. 24). Opět je vidět podobnost s proteomem ovlivněným nanočásticemi. Snížení intenzity lze chápat jako sníženou funkci fotosyntézy, porušený energetický metabolismus a nižší produkci biomasy. Zajímavé je zjištění, že na obou obrázcích (obr. 24 a 26) je zaznamenán stejný spot 2701. Zde je názorně vidět, že v obou případech došlo ke snížení intenzity z přibližně stejné hodnoty, avšak snížení intenzity vlivem nanočástic bylo výraznější.

Rozdíl oproti nanočásticím je vidět až na obr. 32, který znázorňuje změnu v množství proteinů po jednodenním a čtyřdenním působení bulk formy. U sedmi spotů došlo ke zvýšení intenzity oproti kontrole a u pěti byla intenzita snížena. Spoty 2705, 3302, 3701, 5304 a 7101 jsou svými hodnotami intenzit srovnatelné se spoty na obr. 34, který charakterizuje působení nanočástic. Stejně jako v případě nanočástic lze tyto spoty označit jako ty, které charakterizují adaptaci rostliny na akutní stresové podmínky. Je vidět, že bulk forma nezpůsobila tak výrazný akutní oxidativní stres jako nanočástice, a adaptace rostliny není tak rozsáhlá. Pokles intenzity opět odpovídá inhibici fotosyntézy a snížené produkci biomasy.

Na obrázcích 22 a 30 je znázorněno přímé porovnání proteomů ovlivněných nanočásticemi a bulk formou. S přihlédnutím k ose y je patrné, že změny intenzit jsou u většiny spotů zanedbatelné. Po jednodenním působení (obr. 22) se jeví jako výraznější snižování intenzity spotů po působení nanočástic oproti bulk. Dalo by se to vysvětlit jako výraznější vliv nanočástic na narušení energetického metabolismu a degradaci strukturálních proteinů. Po čtyřdenním působení se naopak jeví jako výraznější zvyšování intenzity spotů po působení nanočástic oproti bulk., což by se dalo chápat jako výraznější adaptace rostlin vůči stresu.

Působení síranu měďnatého (sůl). Zou a kol. (2014) sledoval působení chloridu měďnatého (Cu^{2+} stejně jako u síranu) na mořské řase *Sargassum fusiforme*.

Rozdělil časový vliv iontů na akutní (1 den) a chronický (7 dnů). Jako následek akutního stresu uvedl snížení množství proteinů účastnících se energetického metabolismu a fotosyntézy. Ke zvýšení množství došlo u proteinů účastnících se sacharidového metabolismu a degradace RNA. Chronický stres výrazně indukoval proteiny spojené se spotřebou energie, proteiny sacharidového a energetického metabolismu a fotosyntézy. V menším množství byly obsaženy transportní proteiny a proteiny membrán.

Vliv soli hodnotil i Roy a kol. (2016) u *Sorghum*. Sledoval pětidenní působení síranu měďnatého. Došlo ke zvýšení intenzity spotů charakterizujících proteiny stresové reakce, transportu a proteinů účastnících se metabolismu sacharidů. K úbytku došlo u proteinů energetického metabolismu a fotosyntézy.

Tang a kol. (2016) zmiňuje, že Cu^{2+} ionty silně inhibují růst kořenového systému a zvyšují obsah reaktivních forem kyslíku stejně jako nanočástice, avšak s delším časovým odstupem. Stejně jako nanočástice působí oxidační poškození DNA (Atha a kol. 2012). Inhibice fotosyntézy se dle Regiera a kol. (2015) jeví stejně jako u nanočástic závislá na čase.

Na proteinové mapě po jednodenním působení síranu je zřetelné zvýšení intenzity naprosté většiny spotů oproti kontrolnímu vzorku (obr. 20). Toto zvýšení lze vysvětlit jako akutní reakci na stresové podmínky. Snížení intenzity u třech spotů může znamenat degradaci strukturních proteinů nebo snížení energetického metabolismu.

Čtyřdenní působení síranu mělo na proteom velmi negativní vliv. Výrazné změny byly pozorovány již na rostlinách (obr. 8). Počet spotů byl viditelně snížen, pravděpodobně zvýšenou degradací proteinů (obr. 27). Software našel pouze tři rozdílné spoty (obr. 28). U všech spotů byla vlivem čtyřdenního působení síranu měďnatého snížena intenzita oproti kontrolnímu vzorku. Velmi výrazná změna nastala u spotu 7001. Dle Černého a Brzobohatého (2010) se jedná o enzym Rubisco, který se účastní fotosyntézy. Je zřejmé, že v tomto případě nenastala žádná adaptační reakce rostliny. Obr. 28 jednoznačně zobrazuje výrazný toxický vliv měďnatých iontů.

Na obrázku 35, který porovnává jednodenní a čtyřdenní vliv měďnatých iontů na proteom, je patrné snížení intenzity u téměř všech spotů. Z toho vyplývá, že toxický vliv soli byl postupem času prohlubován. U spotů, jejichž intenzita byla po delším působení soli zvýšena, byl rozdíl intenzit velmi malý, proto není třeba je považovat za významné.

Jako nejvíce toxická forma mědi byla, jak se předpokládalo, sůl, za ní následují nanočástice a nejnižší toxicita byla pozorována u bulk formy. Toxického účinku se v případě různých forem částic účastní různé buněčné mechanismy (Gomes a kol. 2014). Rozdíl mezi toxicitou nanočástic a bulk formy CuO je dán schopností průniku do kořenového systému, který může souviset s velikostí částic. Nejlépe pronikají měďnaté ionty díky dobré rozpustnosti ve vodě, následují nanočástice, a nejméně prostupuje bulk forma CuO. Tato skutečnost však neplatí pro všechny sloučeniny. Jako příklad lze uvést oxid titaničitý, kde se nanočástice jeví jako méně toxické než bulk forma (Karlsson a kol. 2009). Vliv nanočástic na rostliny je variabilní i dle druhu rostliny. Atha a kol. (2012) uvádí, že působení nanočástic oxidu zinečnatého způsobilo u *Lolium perenne* inhibici kořenového růstu, zatímco u *Cucurbita pepo* nebyla tato inhibice pozorována.

Protože nanočástice CuO dobře pronikají kořenovým systémem a jsou rostlinou akumulovány, jeví se vůči rostlině jako toxické. Využití fytořemediace při dekontaminaci nanočástic CuO z životního prostředí je zvláště při vysokých koncentracích velmi diskutabilní.

8 ZÁVĚR

Bylo zjištěno, že:

- vliv různých typů částic mědi na rostliny odpovídá účinku mědi jako takové; je-li v nadbytku, jeví se jako toxická,
- toxicita částic mědi souvisí s jejich velikostí; nejmenší částice nejlépe pronikají pokožkou kořenového systému a ukládají se v rostlině ve větším množství,
- nanočástice CuO jsou pro rostlinu toxičtější než standardní velikost částic CuO; vysoká toxicita rozpustné formy CuSO₄ byla očekávána,
- po jednodenním působení vyvolají částice CuO v rostlině akutní obrannou reakci, po čtyřdenním působení dojde k částečné adaptaci rostliny nebo k prohloubení toxicity částic,
- fytoremediaci nelze doporučit při dekontaminaci nanočástic CuO z životního prostředí kvůli jejich negativnímu vlivu na rostliny již v nízkých koncentracích.

9 SEZNAM ZKRATEK

2D-PAGE	Dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propanosulfonát
IEF	Isoelektrická fokusace
MALDI	Desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice
ME	2-Merkaptoethanol
MS	Murashige a Skoog
PAGE	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PCB	Polychlorované bifenyly
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
POD	Peroxidáza
Rubisco	Ribulózabisfosfátkarboxyláza/oxygenáza
SDS	Dodecylsulfát sodný
SOD	Superoxid dismutáza
UV	Ultrafialové záření
TCA	Trichloctová kyselina
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZR	Zásobní roztok

10 POUŽITÁ LITERATURA

1. Aruoja, V., Dubourguier, H-C., Kasemets, K., Kahru, A. (2009) Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment*. 407, 1461-1468.
2. Atha, D. H., Wang, H., Petersen, E. J., Cleveland, D., Holbrook, R. D., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Xing, B., Nelson, B. C. (2012) Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environmental Science and Technology*. 46, 1819-1827.
3. *AZONANO* – Physics in nanomedicine: Interfaces and mechanical properties of nanomaterials and biological systém with AFM [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3012>.
4. Babula, P., Opařilová, R., Kryštofová, O., Zehnálek, J., Adam, V., Havel, L., Kizek, R. (2010) Význam a vliv mědi na rostliny. *Listy cukrovarnické a řepařské* 126, 11.
5. *BIO-RAD* – 2-D Electrophoresis [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-uk/applications-technologies/2-d-electrophoresis>.
6. Canovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H-P., Rossignol, M. (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4, 285-298.
7. *Creative Proteomics* – 2D Electrophoresis [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.creative-proteomics.com/services/2d-electrophoresis.htm>.
8. Cyrusová, T., Podlipná, R., Vaněk, T. (2015) Vliv nanočástic na rostliny. *Chem. listy* 109, 276-280.
9. Černý, M. a Brzobohatý, B. (2010) Modern proteomics in plant science.
10. Černý, M., Skalák, J., Kurková, B., Babuliaková, E., Brzobohatý, B. (2011) Využití komerční metody imunochemického odstranění Rubisco v analýze rostlinného proteomu. *Chem. listy* 105, 640-642.
11. Da Costa, M. V. J., Sharma, P. K. (2016) Effect of copper oxide nanoparticles on grow, mophology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*. 54, 110-119.

12. Dadáková, K. (2015): *Molekulární markery obranné reakce u rostlin*. Disertační práce. Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, 153 stran.
13. Deng, F., Wang, S., Xin, H. (2016) Toxicity of CuO nanoparticles to structure and metabolic activity of *Allium cepa* root tips. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicity*. 97, 702-708.
14. Dvořáková, P., Hernychová, L., Vojtěšek, B. (2014) Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klin. Onkol.* 27, 104-109.
15. Fišer, J., Nováková, M., Macek, T. (2014) Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků rostlin. *Chemické listy* 108, 566-571.
16. Friedecký, D. a Lemr, K. (2012) Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.*, 20(41), 152-157.
17. Gomes, T., Chora, S., Pereira, C. G., Cardoso, C., Bebianno, M. J. (2014) Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology*. 155, 327-336.
18. Hanzl, M. (2008) *Arabidopsis thaliana* – huseníček rolní [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://www.naturabohemica.cz/arabidopsis-thaliana/>.
19. Holešínská, I. (2006): *Multidimenzionální separace v analytické chemii*. Bakalářská práce. Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 66 stran.
20. Hoskovec, L. (2007) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – huseníček rolní / arábkovka Thalova [cit. 27.1.2017]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/arabidopsis-thaliana/>.
21. Hromadová, S. (2014): *Zpracování výstupů z analýzy obrazů 2D elektroforetických gelů*. Bakalářská práce. Ústav biomedicínského inženýrství, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, 40 stran.
22. Chmelík, J. (2005) Proteomický průvodce. *Chem. listy* 99, 883-885.
23. Jirků, V., Lovecká, P., Čejková, A., Macková, M., Demnerová, K. a Masák, J. (2012) Remediativní funkce mikroorganismů a rotlin. *Chem. listy* 106, 931-935.

24. Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., Möhler, L. (2009) Size-dependent toxicity of metal oxide particles – A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology letters*. 188, 112-118.
25. Kerberová, V. (2015): *Ekotoxikologie nanočástic*. Bakalářská práce. Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, 48 stran.
26. Kovářová, H. (2005) Proteomika v postgenomové době. *Chem. listy* 99, 886-889.
27. Kovářová, H., Trebichavský, I., Bezouška, K. (2005) Odkud a kam míří proteomika? *Živa* 1/2005.
28. Kučerová, P., Macková, M. a Macek, T. (1999) Perspektivy fytořemediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chem. listy* 93, 19-26.
29. Meagher, R. B. (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 153-162.
30. Murashige, T. a Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
31. Navrátil, V. (2008) Rozvoj nanotechnologií a lidské zdraví. *School and Health* 21, 3/2008.
32. Nohavica, D. (2011) Rizika nanomateriálů a nanotechnologií pro lidské zdraví a životní prostředí. *Československý časopis pro fyziku*, 3-4.
33. Ozcan, F., Kahramanogullari, C. T., Kocak, N., Yildiz, M., Haspolat, I. a Tuna, E. (2012) Use of genetically modified organisms in the remediation of soil and water resources. *Fresenius Environmental Bulletin*. Volume 12, No 11b.
34. Pivetz, B. E. (2001) Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites. National Risk Management Research LAB ADA OK.
35. Příbylová, L. (2014) Fytořemediace – využití rostlin a mikroflóry k dekontaminaci půdy. *Aldebaran bulletin* 14.
36. Racek, J. (2012) Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: http://www.e-herbar.net/main.php?g2_itemId=23095.

37. Regier, N., Cosio, C., Moos, N., Slavyekova, V. I. (2015) Effect of copper-oxide nanoparticles, dissolved copper and ultraviolet radiation on copper bioaccumulation, photosynthesis and oxidative stress in the aquatic macrophyte *Elodea nuttallii*. *Chemosphere*. 128, 56-61.
38. Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R. a Gardea-Torresdey, J. L. (2011) Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Agric food chem*. April 27.
39. Richter, R. (2004) Měď [cit. 16.4.2017]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogeni_prvky/cu.htm.
40. Řepková, J. (2007) Huseníček rolní a současný výzkum rostlinného genomu. *Živa*. 1/2007.
41. Salava, J. (2013) Fytoremediace [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/fytoremediace-1/>.
42. Seidlová, H. (2013): *Biotransformace flubendazolu a albendazolu v rostlinných buňkách*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 46.
43. Skala, O. (2011) Rostlinné kultury *in vitro* I. [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: http://www.zelenelisty.cz/clanky/botanicke-tahaky-_botanical-cribs_/rostlinne-kultury-in-vitro-i.html.
44. Skalák, J., Černý, M., Mitošinková, I., Brzobohatý, B. (2010) Komparace 2D elektroforetických přístupů pro sledování proteomického profilování rostlin.
45. Soudek, P., Petrová, Š., Benešová, D., Kotyza, J. a Vaněk, T. (2008) Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chem. listy* 102, 346-352.
46. Sovová, T. a Kočí, V. (2012) Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chem. listy* 106, 82-87.
47. Stampoulis, D., Sinha, S. K., White, J. C. (2009) Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9473-9479.
48. Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., Maule, A. J. (2009) The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 21, 642-654.

49. Šeda, O., Liška, F., Šedová, L. (2006) Úvod do proteomiky [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/proteomika.htm>.
50. Tang, Y., He, R., Zhao, J., Nie, G., Xu, L., Xing, B. (2016) Oxidative stress-induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution*. 212, 605-614.
51. Vaňková, H. (1999) Peptidové mapy. *Chem. listy* 93, 120-127.
52. Wang, S., Liu, H., Zhang, Y., Xin, H. (2015) The effect of CuO NPs on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34, 554-591.
53. *Wikipedia* – Phytoremediation [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/22/Phytoremediation_Process_-_svg.svg.
54. Yruela, I. (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17, 145-156.
55. Zou, H-X., Pang, Q-Y., Zhang, A-Q., Lin, L-D., Li, N., Yan, X-F. (2015) Excess copper induced proteomic changes in the marine brown algae *Sargassum fusiforme*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111, 271-280.