

1

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra organické a jaderné chemie**

**INTERAKCE „IN VITRO“ KULTIVOVANÝCH  
ROSTLINNÝCH BUNĚK  
S ETHYNYLESTRADIOLEM**

**Bakalářská práce**

**PRAHA 2006**

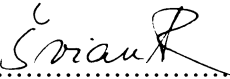
**Lubomír Šviantek**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne...4.6.2006...

  
.....  
podpis

# OBSAH

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. STEROIDNÍ HORMONY	7
2.1.1. Endokrinní systém	7
2.1.2. Rozdělení steroidních hormonů	7
2.1.3. Estrogeny	8
2.1.4. Estrogenní hormony v medicíně	9
2.1.4.1. Kontraceptiva	9
2.1.4.2. Hormonální substituční léčba	9
2.1.4.3. 17 $\alpha$ -estradiol	11
2.1.4.4. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol	11
2.2. OSUD STEROIDNÍCH HORMONŮ V EKOSYSTÉMU	12
2.2.1. Vstup steroidních hormonů do ekosystému	12
2.2.2. Metabolismus xenobiotik	13
2.3. FYTOREMEDIACE	15
2.3.1. Fytoextrakce	18
2.3.2. Fytostabilizace	18
2.3.3. Rhizofiltrace	19
2.3.4. Fytodegradace	19
2.3.5. Fytovolatilizace	19
3. CÍL PRÁCE	20
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1. POUŽITÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE	21
4.1.1. Chemikálie	21
4.1.2. Rostlinný materiál	21
4.1.3. Přístroje	21
4.2. KULTIVACE	22
4.2.1. Příprava in vitro kultur	22
4.3. FYTOEXTRAKCE	23
4.3.1. Fytoextrakce 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu	23
4.3.2. Extrakce tuhou fází	24

4.3.3. HPLC stanovení 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu	25
4.4. IZOLACE PRODUKTŮ BIOTRANSFORMACE	25
4.4.1. Analýza rostlin	25
4.4.2. Analýza media	26
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	27
6. ZÁVĚR	33
7. SEZNAM ZKRATEK	34
8. PODĚKOVÁNÍ	35
9. LITERATURA	36

# 1 ÚVOD

Zvyšující se úroveň kvality a komfortu lidského života, která je podporována rychlým rozvojem vědy a techniky, s sebou přináší i řadu negativ. Mezi tyto negativní jevy patří především kontaminace ekosystému jak produkty tak, i odpadními látkami chemického, strojírenského, hutnického, energetického a farmaceutického průmyslu. Častá je i kontaminace půd a vod produkty spotřební chemie. Kontaminace ekosystému již dosáhla takové úrovně, která výrazně zvyšuje zdravotní rizika, kterým je člověk v současné době vystaven. Vlivem neznalosti biologických vlastností nově vyráběných látek dochází k občasnému poškozování životního prostředí. Příčinou nemusí být pouze vyráběná látka, ale i meziprodukty a vedlejší produkty. Situace je o to vážnější, protože pro řadu synteticky vyrobených látek si příroda ještě nestačila vytvořit účinné mechanismy na jejich degradaci.

Existuje velké množství farmakologicky aktivních látek, které jsou každodenně užívány pro terapeutické i profylaktické a které následně kontaminují životní prostředí svými zbytkovými koncentracemi a metabolity vylučovanými především močí, která přechází do komunálních odpadních vod. Během posledních padesáti let výrazně vzrostla spotřeba chemických léčiv, mezi nimi i přirozených a syntetických estrogenů. Přirozené hormony jsou při perorálním použití často inaktivovány v trávicím traktu, proto jsou pro farmakoterapeutické účely vyráběny více stabilní syntetická analoga estrogenů. Estradiol je jeden z hlavních ženských sexuálních hormonů a jeho steroidní skelet je shodný se skeletem některých vyráběných syntetických estrogenů (např. ethynylestradiol, mestranol, estradiol valerát), které jsou užívány v lidské hormonální léčbě.

Stejným způsobem jako jsou v medicíně využívány estrogény, jsou i v některých případech léčby nasazovány progesterony. V chovu zvířat jsou estrogény a progesterony užívány hlavně jako růstové promotory.

Místem, kde se nejčastěji rizikové látky zachycují, jsou především říční sedimenty a půda. Půda poutá znečišťující látky dopadající na její povrch z atmosféry a hlavně absorbuje rozpuštěné kontaminanty z povrchových vod.

V současné době, kdy si stále více uvědomujeme ekologické dopady industrializace a konzumního života naší společnosti, je tématu značného rozšíření synteticky připravených látek a kontaminaci ekosystému věnována celosvětově velká pozornost.

Hlavním cílem je snaha vyvinout a používat takové dekontaminační metody, které by byly šetrné k životnímu prostředí a které by nebyly ekonomicky náročné. Existuje řada fyzikálně-chemických metod. Ty jsou však destruktivní ve vztahu k vlastnostem půd a následná rekultivace je jak technologicky, tak i ekonomicky velmi náročná. Jedním ze slibných alternativních způsobů je biologická dekontaminace půd. Při použití biologického procesu je půda zbavena polutantů za současného zachování základních vlastností půdního systému a je možné i nadále využívat dekontaminované plochy například pro zemědělské účely. Pro tyto účely se zdá být vhodné užití vyšších rostlin. Úspěšné využití je však podmíněno podrobnými znalostmi o pochodech, které při těchto procesech v rostlinách a na rozhraní mezi kořeny rostlin a vlastní půdou probíhají.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 STEROIDNÍ HORMONY

#### 2.1.1 Endokrinní systém

Endokrinní a nervový systém tvoří funkční jednotku regulací, přičemž rychlé regulační zásahy jsou zprostředkovány nervstvem, volnější regulaci udržování homeostázy pak zajišťuje systém vnitřní sekrece. Centrální nervová soustava ovlivňuje však také endokrinní sekreci a naopak hormony mohou ovlivňovat pochody probíhající v nervové tkáni.

Endokrinní systém používá k přenosu informací látek, které se nazývají hormony. Hormony jsou specifické látky se silným fyziologickým účinkem. Jsou sekretovány zvláště uzpůsobenými tkáněmi a působí regulačně, excitačně nebo inhibičně, na činnost jiných tělních orgánů.

Endokrinní systém řídí výživu, metabolismus, růst a zrání, reprodukci a stálost vnitřního prostředí, jako je tělesná teplota, krevní oběh, hospodaření vodou a elektrolyty.<sup>1</sup>

#### 2.1.2 Rozdělení steroidních hormonů

Steroidní hormony převážně vznikají ve steroidogenních orgánech, jimiž rozumíme kůru nadledvinek, gonády a placentu. Kromě toho však vznikají z prohormonů i mimo steroidogenní orgány. Například ve vlasových folikulech, játrech, lymfocytech aj.

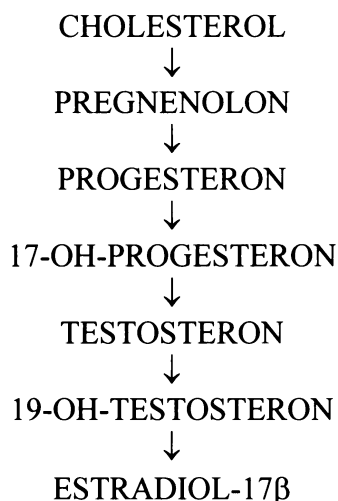
Steroidní hormony se dají rozdělit podle biologického účinku do pěti skupin.

- Glukokortikoidy – C-21 steroidy (kortisol, kortison)
- Mineralokortikoidy – C-21 steroidy (aldosteron, deoxykortikosteron)
- Androgeny – C-19 steroidy (testosteron, androstendion,)
- Estrogeny – C-18 steroidy (estradiol, estron, estriol)
- Gestageny – C-21 steroidy (progesteron)<sup>2</sup>

Obecné cesty syntézy jsou ve všech těchto tkáních podobné. Základním steroidním prekursorem je cholesterol, který vzniká v organismu biosyntésou z acetylkoenzymu A. Účinkem hypofyzárních hormonů se cholesterol konvertuje na C-21 steroid

pregnenolon, vlastní základní prekurzor všech steroidních hormonů. Cholesterol je částečně přijímán i v potravě.

Následné schéma ukazuje syntézu estrogenu estradiolu-17 $\beta$  v buňce ovaria.



Všechny typy buněk, které tvoří steroidy, se shodují v postupu tvorby hormonů z cholesterolu k 17-OH-progesteronu, ale další reakce se pro jednotlivé buňky liší. Zdá se, že rozdíly jsou způsobeny přítomností specializovaných enzymových systémů v jednotlivých tkáňových buňkách. Například v buňkách kůry nadledvin je z 17-OH-progesteronu přes 17-OH-deoxykortikosteron syntetizován kortisol. Tato syntéza výrazně převažuje nad syntézou estradiolu-17 $\beta$ .<sup>3</sup>

### 2.1.3 Estrogeny

Názvem estrogeny označujeme přirozené steroidní hormony, které jsou sekretované především v ovariích a řídí samičí pohlavní cyklus, a také synteticky připravené látky jiné struktury s tímto účinkem.

Estrogeny má na samičí genitální aparát růstový a diferenciacní vliv. V mírných dávkách vyvolávají proliferaci děložní sliznice a řadu morfolických i funkčních změn v samičím organismu, které u zvířat vedou k projevům říje.

Estradiol se v organismu rychle inaktivuje, a to převážně v játrech. Produkty jsou především estron a estriol. Tyto látky se vylučují v moči v podobě konjugátů, hlavně glukuronátů a sulfonátů. Estrogeny se vylučují také žlučí.<sup>1</sup>



## **2.1.4 Estrogenní hormony v medicíně**

Největší uplatnění mají estrogény při léčbě v porodnictví, gynekologii a při terapii močových cest. Užívají se hlavně k substituční léčbě při poruše funkce ovarií, nádorů prostaty a jako složka kontraceptiv. Moderní je dnes hormonální substituční léčba v klimakteriu a menopauze.

### **2.1.4.1 Kontraceptiva**

Jako p.o. (per os) kontraceptiva používáme estrogény nebo gestageny, anebo jejich kombinace. Mechanismus působení spočívá v blokádě ovulace útlumem produkce hypofyzárních gonadotropinů vlivem negativní zpětné vazby. Dalším mechanismem je ovlivnění vazkosti hlenu děložního hrdla a vejcovodů, které brání průchodu a nidaci vajíčka. Kontraceptivní účinnost je zaručena působením gestagenů. Estrogény zajišťují především pravidelnost menstruačního cyklu.

Vývoj kontraceptiv směřuje k podávání nejmenšího potřebného množství hormonů při zachování antikoncepčního působení. Tím se sníží nežádoucí účinky, jako například změna tělesné hmotnosti, deprese, žaludeční potíže, bolesti hlavy aj. na minimum. Proto vývoj směřuje od tzv. monofázických, přes bifázické, k trifázickým preparátům, u nichž se v různých fázích menstruačního cyklu podávají rozličné dávky estrogenu a gestagenu. Příklady kontraceptiv jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1).

### **2.1.4.2 Hormonální substituční léčba**

Klimakterium je podmíněno sníženou tvorbou ženských pohlavních hormonů a projevuje se celou řadou subjektivních příznaků, ale i objektivními projevy v důsledku snížení hormonálních hladin. Zcela vymizí menstruační cyklus, dochází k atrofii sliznic v pohlavním ústrojí, vypadávání vlasů aj. Vše je provázáno duševní nevyrovnaností. Nejzávažnějším problémem je osteoporóza, která se po menopauze stále rozvíjí. Jedinou uspokojivou terapií je právě hormonální substituce.<sup>7</sup>

**Tab. 1:** Přehled kontraceptivních preparátů a jejich účinné složky.

Typ kombinace přípravku <i>účinné komponenty</i>	Název přípravku	estrogen (mg)	progestin (mg)
<b>Monofázické přídatky</b>			
<i>Ethinylestradiol</i> + <i>Gestoden</i>	FEMODEN	0,03	0,075
+ <i>Desogestrel</i>	JANETTEN	0,03	0,150
+ <i>Levonorgestrel</i>	GRAVISTAT 125	0,05	0,125
+ <i>Norgestrel</i>	STEDIRIL	0,05	0,500
+ <i>Norethisteron</i>	NON-OVLON	0,05	1,000
<b>Bifázické přídatky</b>			
<i>Ethinylestradiol</i> + <i>Levonorgestrel</i>	ANTEOVLIN	0,05 (11 tbl.) 0,05 (10 tbl.)	0,050 0,125
<b>Trifázické přídatky</b>			
<i>Ethinylestradiol</i> + <i>Norgestimát</i>	PRAMINO	0,035 (7 tbl.) 0,035 (7 tbl.) 0,035 (7 tbl.)	0,100 0,215 0,250
+ <i>Gestoden</i>	MILVANE	0,03 (6 tbl.) 0,04 (5 tbl.) 0,03 (10 tbl.)	0,050 0,070 0,100
+ <i>Levonorgestrel</i>	TRINORDIOL 21	0,03 (6 tbl.) 0,04 (5 tbl.) 0,03 (10 tbl.)	0,050 0,075 0,125

Existují i další oblasti užití steroidních hormonů, ale jedná se spíše o doplňkovou léčbu.

Estrogeny mohou mít například jistý vliv při léčbě Alzheimerovy nemoci, kde jsou estrogenní hormony používány jako hormonální substituční terapie a zvyšují tvorbu acetylcholinu.<sup>4</sup>

Estrogeny jsou u žen zodpovědné za příznivější hodnoty lipoproteinů než u mužů. Mohou tedy být užity jako hypolipidemika<sup>5</sup>

Bývají rovněž užívány i jako protinádorová chemoterapeutika při karcinomu prostaty a prsu.<sup>6</sup>

### 2.1.4.3 17 $\alpha$ -estradiol (A)

1,3,5-Estratrien-3,17 $\alpha$ -diol

CAS number: 57-91-0

*Vlastnosti:*

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Teplota tání 220 až 223 °C.<sup>8</sup>

### 2.1.4.4 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (B)

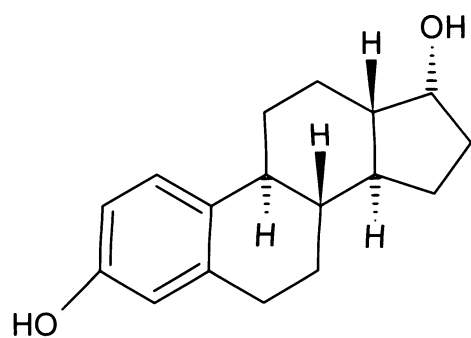
Pro praktické užití byly syntetizovány některé vysoce účinné estrogény, které se liší od přirozeně se vyskytujících estrogenů. Ethynylestradiol je modifikací přirozeného hormonu estradiolu, vycházejícího z estranového skeletu.

19-nor-17 $\alpha$ -pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-3,17-diol.

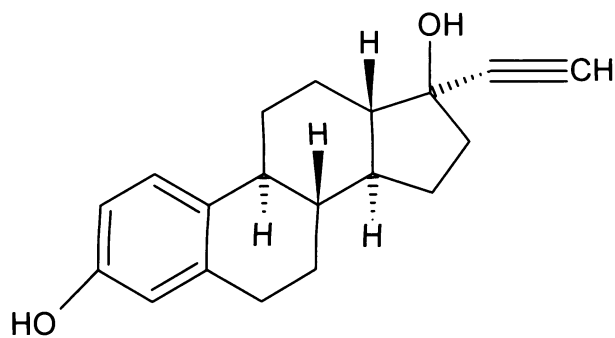
CAS number: 57-63-6

*Vlastnosti:*

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný v 96% ethanolu. Rozpouští se ve zředěných alkalických roztocích. Vykazuje polymorfismus.<sup>9</sup> Teplota tání 142 – 146.<sup>10</sup>



A



B

## **2.2 OSUD STEROIDNÍCH HORMONŮ V EKOSYSTÉMU**

### **2.2.1 Vstup steroidních hormonů do ekosystému**

Přírodní a syntetické estrogény jsou ve velké míře užívány pro lékařské účely. Savci vylučují estrogenní hormony v moči ve formě konjugátů jako sulfáty a glukuronáty a v nezměněné formě ve výkalech. Takto se snadno dostanou do komunálních odpadních vod.<sup>11</sup>

Odpadní vody se dostávají do čističek odpadních vod, kde podléhají úpravám sestávajících většinou ze tří stupňů. První tvoří mechanické čištění, zahrnující filtraci a sedimentaci. Obvykle následuje zpracování chemické, spočívající v chemickém srážení a úpravě pH. Třetí stupeň pak tvoří anaerobní nebo aerobní odbourávání s následujícím oddělováním kalů, prováděné pomocí mikroorganismů v bioreaktorech různých typů.<sup>12</sup>

Nejvýznamnější cesty, kterými se estrogény dostávají do životního prostředí a dosahují vodních systémů nebo potravní řetězců, jsou odpadní vody vypouštěné z čističek odpadních vod, vypouštěním nepřečištěných odpadů a odtokem biologických hnojiv a splaškových kalů užívaných v zemědělství.

Lidská exkrece je považována za nejdůležitější zdroj estrogenů a hormonů obecně. Vylučované hormony (hlavně ve vodě rozpustné konjugáty) a metabolity jsou soustřeďovány do kanalizace a končí v čističkách odpadních vod, kde jsou používány rozdílné procesy s různou efektivitou. Studie naznačily, že čisticí procesy pomocí aktivovaného kalu mohou odstranit více než 85% estradiolu, estriolu, ethynylestradiolu a menší procento estronu. Koncentrace nekonjugovaných steroidů v odpadních vodách po přečištění byla příležitostně nalezena vyšší než odpovídající koncentrace na přítoku do čističek odpadních vod. To je způsobeno přítomností  $\beta$ -glukuronidasy a arylsulfatasy v některých těchto systémech, které přeměňují konjugované deriváty zpět na více biologicky aktivní volné látky.<sup>13</sup>

Pokročilejší techniky čištění vod užívající UV záření, ozonifikaci či aktivované živočišné uhlí mohou výrazně zlepšit odstraňování těchto sloučenin, ale tyto techniky nejsou široce rozšířeny, protože jsou finančně dosti nákladné. Současné čističky odpadních vod v Evropské unii používají aktivované kaly, které v mnoha případech nemohou odstranit všechny estrogény z odpadních vod.<sup>14</sup>

Jak již bylo zmíněno výše, kontaminace vodních zdrojů estrogeny může také nastat odtokem biologických hnojiv a splaškových kalů aplikovaných na zemědělských polích. Mnoho látek přidávaných do krmiv podávaných zvířatům končí v jejich exkrementech. Když e to hnojivo nebo kal z kanalizačních čističek aplikováno na pole, může nastat kontaminace látkami samotnými, nebo jejich metabolity. Všechny tyto látky mohou poté prosáknout do podzemních vod a nebo mohou být odplaveny do povrchových vod.

Dalším stále více významným zdrojem estrogenů pro životní prostředí je chov ryb. V akvakultuře se používají krmná aditiva, která obsahují hormony, obsah kultivačních nádrží je běžně vypouštěn rovnou do vodních toků.<sup>15</sup>

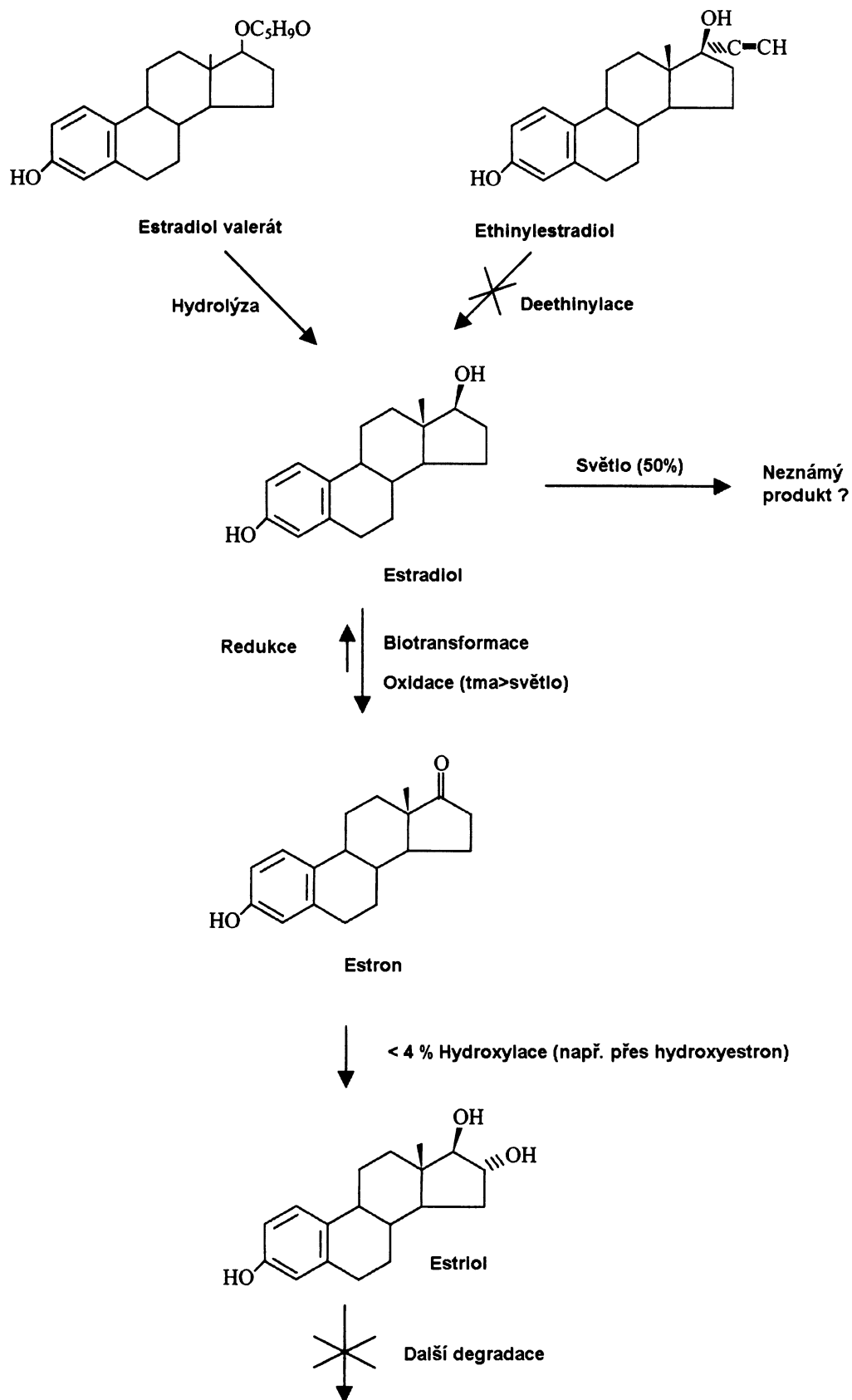
## 2.2.2 Metabolismus xenobiotik

U živočichů dochází k metabolismu xenobiotik v játrech, kde jsou nepolární (lipofilní) látky převáděny na rozpustnější formy. Ty jsou pak jednoduše vylučovány v moči. Metabolismus xenobiotik v játrech probíhá ve třech fázích. V první fázi enzymy oxidují, redukují nebo hydrolyzují substrát, zavádějí reakční skupiny, které později usnadňují jejich konjugaci se sloučeninami, jako je glutathion nebo glukuronát. Těchto reakcí se zúčastňují enzymy druhé fáze. Ve třetí fázi jsou hydrofilní konjugáty vylučovány v moči.

Metabolismus xenobiotik u rostlin můžeme také rozdělit do tří obdobných fází, přestože rostliny nemají skutečnou efektivní cestu vylučování . Transformační (1. fáze) a konjugační (2. fáze) jsou obdobné, ukládání (3. fáze) nahrazuje vylučování. Místem ukládání v buňkách jsou vakuoly pro rozpustné a buněčná stěna pro nerozpustné konjugáty. Rostliny se podobají játrům i svou schopností metabolizovat široké spektrum xenobiotik, včetně polychlorovaných a polycyklických uhlovodíků. Rostliny se díky tomu nazývají "zelená játra" planety a hrají významnou roli při metabolizaci polutantů v životním prostředí.

Bylo dokázáno, že rostliny obsahují enzymy, které se v mnoha aspektech podobají některým enzymovým systémům v játrech. Jsou to cytochrom P-450 monooxygenasy, glutathiontransferasy a peroxidasy.<sup>16</sup>

Příklad možné biotransformace estrogenů uvádí ve své práci<sup>17</sup> K. M. Lai, M. D. Scrimshaw a J. N. Lester, kteří navrhli možné biotransformační dráhy steroidních estrogenů v interakci s *Chlorella vulgaris*. (obr. 1). Řada metabolitů z uvedeného schématu byla v citování práci identifikována a prokázána GC-MS.



Obr. 1: Schéma biotransformace estradiolu a 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu v *Chlorella vulgaris*

## 2.3 FYTOREMEDIACE

Fytoremediace je metoda definovaná jako technologie využívající rostlin k fixaci, akumulaci a rozkladu nebezpečných kontaminantů, tj. k jejich odstranění z životního prostředí. Metoda zahrnuje využití vegetace pro *in situ* remediace půdy, sedimentů a vody. Vybrané rostliny se využívají k extrakci iontů toxických kovů, včetně radioaktivních izotopů, i k odstranění některých organických látek z uvedených abiotických složek. Pro úspěšnou remediaci je nutná biologická přístupnost kontaminantů z vody a půdy do rostliny, která je dána zejména rozpustností látky, typem půdy a stářím kontaminace.

Důvodů pro rozvíjení této technologie je několik. Především lze dosáhnout snížení nákladů při dekontaminačních procesech. Metoda předpokládá využití známých agrotechnických postupů běžně používaných při zemědělském hospodaření. Z toho vyplývá, že finanční vstupy jsou obecně nízké a náklady na průběh remediace minimální.

Další výhodou fyto­remediace je šetrný přístup k prostředí, neboť metoda se vyhýbá odstranění půdy a použití těžké techniky. Z tohoto pohledu je metoda příznivě přijímána veřejným míněním.<sup>18</sup>

Fyto­remediační technologie se postupně stává jedním z procesů, který výrazně přispívá k odstranění xenobiotik z životního prostředí. Navíc podobné procesy probíhají v přírodě zcela přirozeně a vzhledem k obrovskému množství rostlinné biomasy není tento přirozený příspěvek k dekontaminaci rozhodně zanedbatelný.

Hodnotíme-li fyto­remediační proces, nelze opomenout i určité nevýhody, které tato technologie v sobě skrývá. Především se jedná o dlouhodobý dekontaminační proces, který nelze uskutečnit v průběhu jednoho vegetačního období. Dekontaminace, která je obvykle úměrná množství vyprodukované biomasy, je potom závislá na povaze půdy, obsahu dostupných živin, klimatických podmínkách, ale zároveň i na charakteru polutantu a jeho toxicitě vůči použitému rostlinnému druhu.<sup>19</sup> Kontaminanty se mohou hromadit v listech a mohou být znovu uvolňovány (např. při opadávání listů) do prostředí. V některých případech se zvyšuje rozpustnost polutantů a může dojít k jejich rozšíření do okolního prostoru.<sup>19</sup>

Rostliny při dekontaminaci uplatňují několik mechanismů:

- Přímá absorpce kořeny. Následuje přesun xenobiotik do rostlinné tkáně a akumulace ve formě nefytotoxických metabolitů. Nerozpustné látky se většinou váží na pevně na povrch kořenů. Látky s vyšší rozpustností jsou transportovány do cílových rostlinných tkání, kde mohou být metabolizovány na nefytotoxické produkty a ukládány např. do vakuol nebo buněčných stěn.
- Uvolňování enzymů do prostředí. Enzymy podporují mikrobiální aktivitu a biochemickou transformaci v půdě. Mezi hlavní enzymové systémy nalezené v půdě z kontaminovaných míst, které se pravděpodobně podílejí na přeměnu organických látek v životním prostředí, patří dehalogenasy, reduktasy, organických sloučenin, lakasa (fenoloxidas) a nitrilasy.
- Zvýšená mineralizace látek v rhizosféře, která je typická pro činnost hub a mikrobiálních organismů. Rostliny napomáhají mikrobiální mineralizaci v rhizosféře tím, že uvolňují do půdy látky, které mohou sloužit mikroorganismům jako zdroj uhlíku a energie pro metabolismus organických polutantů v životním prostředí.

Faktory ovlivňující úspěšnost použité fytoremediační technologie:

- Přítomnost rostlin, které jsou schopné efektivně degradovat polutant.
- Schopnost rostlin těchto rostlin metabolizovat polutant akceptovatelnou rychlostí na výslednou koncentraci polutantu povolenou zákonem.
- Vznik produktů (meziproduktů), které by v dosažené koncentraci byly toxické.
- Přítomnost dalších chemických látek či směsí na kontaminované lokalitě, které potlačovaly růst a metabolickou aktivitu degradační flory.
- Dostupnost polutantů rostlinám.
- Zajištění nezbytných podmínek stimulující růst a metabolickou aktivitu použitých rostlin např. anorganické živiny, kyslík nebo vhodné akceptory elektronů, stopové prvky, vlhkost prostředí, teplota, pH, zdroj uhlíku a energie.
- Cena technologie musí být nižší než cena jiné technologie schopné destruovat cílový polutant.



Pro rozdílné organické a anorganické látky je vhodné užití specifických typů rostlin. Často se používá vojtěška, která má schopnost fixovat dusík a jejíž kořeny zasahují do vhodné hloubky. Dále se při fytořediačních technikách osvědčily stromy rodu *Salicaceae* (topoly a vrby), které jsou odolné a relativně rychle rostou. Řebříček vodní byl využit při odstraňování škodlivých látek ze podzemních vod.<sup>21</sup> Především hybridní topoly jsou velmi odolné a rychle rostou, avšak tato rostlina je poměrně agresivní, mění výrazně charakter krajiny, rychle se rozšiřuje.<sup>20</sup> Vyšší koncentrace iontů kovů, solí nebo amonných sloučenin jsou pro ni toxické.<sup>16</sup> Příklady aplikací fytořediačních metod v praxi jsou zde ukázány (Tab 2).

**Tab. 2:** Aplikace fytořediace na kontaminovaných místech.<sup>16</sup>

Lokalita	Využití	Typ kontaminantů	Výsledky
Amana, Iowa	hybridní topoly - fytořediace, odstranění kontaminace	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , atrazin, alachlor, půdní eroze	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> a 0,1-20% atrazinu odstraněno
Amana, Iowa	topoly, kukuřice - aplikace na půdu s odpadními polutanty	PCB	imobilizace organických látek
Beaverton, Oregon	obecně znečištěná plocha - hybridní topoly	organické látky, kovy, amonné sloučeniny	celkové vyčištění oblasti
New Mexico	<i>Datura sp.</i> , <i>Lycopersicon sp.</i> - kontaminovaná půda	TNT	významné odstranění
Oak Ridge, Tennessee	Borovice, zlatý děš't - půda s organickými škodlivinami	trichlorethylen a další	zvýšení biomineralizace
Childersburg, Alabama	půda se stolístkem	NH <sub>3</sub> , soli	zvýšení degradace

Pro aplikaci fytořediálních technik jsou z praktických důvodů vhodné především rostliny, u kterých je dobře zvládnuta agrotechnika.<sup>18</sup>

Fytořediace lze podle metodického postupu závislého na charakteru znečištěného prostředí, kontaminantu a jeho koncentraci rozdělit na fytoředění a fytořediální technologie.

Fytoředění zahrnuje několik metod:

- fytoextrakce
- rhizofiltrace
- fytoředění
- fytořediace
- fytořediace

### 2.3.1 Fytoextrakce

Metoda spočívá ve vysázení či vysetí vybraných rostlin na kontaminovanou půdu, kde jsou po akumulaci kontaminantů v rostlině sklizeny a dále jsou tepelně, mikrobiálně nebo chemicky zpracovávány. Fytoextrakce je dnes využívána především pro odstranění iontů toxických kovů. Některé druhy rostlin jsou vysoce tolerantní vůči přítomnosti rozpustných forem toxických kovů v půdě a navíc jsou schopny je akumulovat do vysokých koncentrací ve svých pletivech bez nepříznivého vlivu na svůj růst. Takovéto rostliny jsou nazývány hyperakumulátory. Při výběru rostlin pro fytoextrakci je vhodné vzít v úvahu i schopnost akumulovat kovové ionty při nízké koncentraci v půdě, akumulovat více druhů iontů, odolávat jejich vysokým koncentracím v půdě a tvořit dostatečné množství biomasy. Příklady hyperakumulátorů jsou uvedeny v následující tabulce (Tab 3).<sup>18</sup>

**Tab. 3:** Příklady rostlinných hyperakumulátorů těžkých kovů.<sup>20</sup>

Ionty těžkých kovů	rostlinný druh	koncentrace kovu po sklizni (mg/kg sušiny)
kadmium	<i>Thlaspi caerulescens</i>	1 800 ve výhoncích
měď	<i>Ipomoea alpina</i>	12 300 ve výhoncích
kobalt	<i>Haumaniastrum robertii</i>	10 200 ve výhoncích
olovo	<i>Thlaspi rotundifolium</i>	8 200 ve výhoncích
mangan	<i>Macadamia neurophylla</i>	51 800 ve výhoncích
nikl	<i>Psychotria douarrei</i>	47 500 ve výhoncích
	<i>Seberia acuminata</i>	25% hm. sušiny dřeva
zinek	<i>Thlaspi caerulescens</i>	51 600 ve výhoncích

### 2.3.2 Fytostabilizace

Fytostabilizace je proces, který je užívat pro zastavení šíření polutantu do okolí. Kořenové systémy mohou v některých případech omezit migraci kontaminantů v půdě.<sup>17</sup> Rostliny mohou stabilizovat kontaminanty ve svých orgánech pomocí:

- redoxních přeměn (např. redukce Cr<sup>VI</sup> na Cr<sup>III</sup>)
- převedení kontaminantů do nerozpustné formy (např. olovo ve vazbě s fosfátem)
- zabudování do rostlinných struktur

### 2.3.3 Rhizofiltrace

Obdobná metoda jako fytostabilizace je rhizofiltrace. Tato metody využívá k absorpci, koncentraci a precipitaci xenobiotik z proudící, znečištěné vody kořeny živých rostlin. Metoda je vhodná především pro odstranění nízkých koncentrací rozpuštěných kovů, kdy nelze efektivně využít jinou dekontaminační metodu.

### 2.3.4 Fytodegradace

Při užití této technologie degradují rostliny a s nimi asociovaná mikroflóra kontaminanty na netoxické produkty. Jde o detoxikaci především organických látek, které jsou rostliny schopné metabolizovat pomocí svého enzymatického aparátu zapojeného do detoxikační reakce. Podmínkou fytodegradace je absence produktů, které by byly v příslušné koncentraci toxické buď pro rostlinu samotnou, nebo pro ostatní organismy.

Fytodegradace byla doposud použita při dekontaminaci následujících typů látek:

- ropné látky
- PAH
- chlorované pesticidy
- jiné chlorované látky – PCB, TCE
- výbušniny a další nitrosloučeniny
- organofosfátové pesticidy
- detergenty<sup>18</sup>

### 2.3.5 Fytovolatilizace

Některé těžké organické sloučeniny mohou být přijímány rostlinami, difundovat tkání stonku a mohou být v plynném stavu transpirovány do atmosféry. Jedná se například o TCE, PCE, nebo MTBE.<sup>22</sup>

### 3 CÍL PRÁCE

- 1) Ověřit možnost analýzy kultivačního media s obsahem  $17\alpha$ -ethynylestradiolu pomocí HPLC bez a s kultivovanými rostlinami *Brassica napus* a *Zea mays*.
- 2) Ověřit možnost analýzy kultivačního media pomocí HPLC spojenou s přípravou vzorku pomocí SPE.
- 3) Provést fytoextrakční experimenty s výše uvedenými rostlinami na zvolené koncentrační řadě  $17\alpha$ -ethynylestradiolu jako základní informaci o možnostech kořenové fytoextrakce studovaného xenobiotika a odhadnout fytoextrakční účinnost.
- 4) Pokusit se zjistit, zda v průběhu interakce  $17\alpha$ -ethynylestradiolu dochází ke zpětnému vylučování metabolitů xenobiotika do kultivačního media.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 POUŽITÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE

#### 4.1.1 Chemikálie

Anorganické chemikálie, které byly používány pro přípravu kultivačních médií, byly čistoty p.a. (Lachema, ČR). Myo-inositol byl použit v kvalitě pro tkáňové kultury od firmy Sigma-Aldrich. Sacharosa byla dodána firmou Kulich, Hradec Králové.

17 $\alpha$ -ethynylestradiol byl zakoupen od firmy Fluka .

Destilovaná voda pro přípravu mobilních fází HPLC a médií byla vyrobena přístrojem DEMIWA 3 (Watek, ČR).

Pro chromatografické analýzy byl použit methanol pro HPLC (Lab-Scan, UK), k okyselení mobilní fáze kyselina octová od firmy Fluka. Ostatní použité chemikálie byly od firmy Lach-Ner v čistotě p.a.

K rozpouštění 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu pro aplikaci do kultivačního media byl použit dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich).

#### 4.1.2 Rostlinný materiál

Jako biologický materiál byla používána semena kukuřice pukancové (*Zea mays conv. microsperma*, (Seva flora s.r.o., Valtice)) a řepky olejky (*Brassica napus L. var. napus*, (Agrofina spol. s.r.o.)).

#### 4.1.3 Přístroje

Manipulace s rostlinným materiálem probíhala v laminárním boxu Labox BHSL. Pro odpařování rozpouštědel byla používána vakuová rotační odparka Heidolph Laborota Digital 4002 vybavená manostatem.

Rostliny byly kultivovány v kultivačních boxech TCH 100 9 (Laboratorní přístroje, Praha) při teplotě 25 °C a světelném režimu 12 h světlo/12 h tma.

HPLC analýzy byly provedeny na chromatografickém zařízení INCOS. Přístroj se skládal z vysokotlakého čerpadla INCOS LCP 5020, autosampleru INCOS LCS 5040 a

UV detektoru INCOS LCS 5000. Pro měření byla použita kolona o rozměrech 4,4 x 250 mm se sorbetem Reprisil (C – 18, 5 $\mu$ m). Optimalizovaná mobilní fáze pro 17 $\alpha$ -ethynylestradiol měla složení methanol/voda (8/2 v/v) + 0,1 % kyseliny octové. Detekce byl prováděna při vlnové délce 280 nm. Nástřik vzorku byl standardně prováděn automatickým dávkovačem v objemu 20  $\mu$ l. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Ke zpracování a vyhodnocení naměřených hodnot jsem používal chromatografický program Clarity (Data Apex).

Další laboratorní materiál potřebný k experimentu byly hliníkové folie Silikagel 60 F254(Macherey-Nagel, SRN) pro tenkovrstvou chromatografii. Detekce probíhala pod UV světlem o vlnové délce 254 nm.

SPE byla prováděna na zařízení Visiprep SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich). K vytvoření podtlaku bylo použito kompresoru. Byly použity SPE kolony C - 18 (500 mg sorbentu od firem Varian a Supelco).

MS spektra(ESI) byla měřena na přístroji Esquire 3000 (Bruker).

## **4.2 KULTIVACE**

### **4.2.1 Příprava *in vitro* kultur**

Semena jednotlivých rostlinných druhů byla nejdříve povrchově sterilizována v 70% ethanolu po dobu jedné minuty a následně v roztoku chlornanu sodného (10% SAVO) po dobu 20 minut. Poté byla semena třikrát důkladně promyta sterilní destilovanou vodou. Takto upravená semena byla za sterilních podmínek vysázena do sterilních Erlenmayerových baněk s minimálním množstvím média. Pro kukuřice byly použity 500 ml Erlenmayerovy baňky s 10 ml živného média, pro rostliny řepky bylo použité množství media 5 ml v 250 ml baňkách. U obou rostlinných druhů byla vysázena čtyři semena do každé kultivační baňky.

Jako živné medium byl použit roztok anorganických solí MS podle Murashiga a Skooga, který byl obohacen o sacharosu (30g/l) a myo-inositol (100 mg/l), pH media bylo upraveno na 5,8 – 6,0 (kyselinou citronovou nebo roztokem hydroxidu sodného). Medium bylo rozděleno do kultivačních baněk a bylo sterilizováno po dobu třiceti minut. Složení živného media je uvedeno v tabulce (Tab 4).

Rostliny byly kultivovány v kultivačních boxech při teplotě 25°C a světelném režimu 12h světlo / 12h tma. Při nedostatku media během kultivace bylo připraveno nové sterilní medium a za sterilních podmínek bylo přidáno injekční stříkačkou 5 - 10 ml tohoto media. Rostliny dosahovaly optimálních velikostí po třech až pěti týdnech a byly využity k následným experimentům.

**Tab. 4:** Roztok anorganických solí MS dle Murashiga a Skooga

<i>Chemikálie</i>	<i>Koncentrace (mg/l)</i>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl . 2 H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	8,6
Komplexon I	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,3

## 4.3 FYTOEXTRAKCE

### 4.3.1 Fytoextrakce 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu

Fytoextrakce 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu byla prováděna za sterilních podmínek, veškeré manipulace s materiálem byly prováděny v laminárním boxu.

Sterilní medium bylo obohaceno o 17 $\alpha$ -ethynylestradiol tak, aby konečná koncentrace studované látky odpovídala koncentraci 5 mg/l. Xenobiotikum bylo rozpuštěno v dimethylsulfoxidu (1 mg/ml) a odpovídající množství tohoto roztoku bylo přidáno do definovaného objemu media.

Stejným způsobem bylo v 10 ml DMSO rozpuštěno 100 mg 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu. Do medií o objemu 100 ml bylo přidáno 100  $\mu$ l tohoto zásobního roztoku, a tím vzniklo medium o koncentraci 10 mg xenobiotika na litr media.

Z kultur vzrostlých rostlin o stáří ca. 4 týdny bylo přidáno medium obohacené o 17 $\alpha$ -ethynylestradiol K rostlinám řepky byla přidáváno 50 ml media o koncentraci 5 mg/l. K polovině rostlin kukuřice bylo přidáno 100 ml media o koncentraci 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu 5 mg/l a k druhé polovině byla přidáno 100 ml media o koncentraci 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu 10 mg/l.

Ohned po přidání media byl odebrán vzorek média pro stanovení výchozí koncentrace xenobiotika. Rostliny byly dále kultivovány za obvyklých podmínek, tedy při teplotě 25°C a světelném režimu 12h světlo / 12h tma. Další vzorky pro analýzy byly odebírány po 24 hodinách po dobu pěti až devíti dnů. Kultury, které byly kontaminovány, byly vyřazeny z experimentu.

Od rostlin kukuřice byly odebírány vzorky o objemu 10 ml a od rostlin řepky byly odebírány vzorky o objemu 5 ml. Vzorky byly upraveny pomocí SPE a analyzovány HPLC, sledován byl úbytek výchozí látky a signály případných nově se vyskytujících sloučenin.

Xenobiotikum jsem extrahoval pomocí SPE, koncentrace v extraktu byla stanovena pomocí HPLC a přepočítána na původní objem před SPE separací.

Po ukončení odběru vzorků byly rostliny vyndány z kultivačních baněk, omyty destilovanou vodou, osušeny a zváženy. Byly změřeny objemy zbylých kultivačních medií. Jak rostliny tak média byly zmrazeny a uchovávány při -18°C.

#### **4.3.2 Extrakce tuhou fází**

Odebrané vzorky ze živných medií byly extrahovány na SPE kolonách. Byly použity SPE kolony se stacionární fází C-18, která byla zakotvená na silikagelu. Jako eluční rozpouštědlo byl použit methanol. Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Pro optimalizaci průtokové rychlosti bylo použito podtlaku.



Kolonky byly nejprve aktivovány 2 ml methanolu a následně byla propláchnuty 2 ml vody. Poté byl na kolonku aplikován vzorek media. Následovalo promytí kolonky 1 ml vody a kolonka byla sušena po dobu 5 minut. Poté bylo xenobiotikum vymyto methanolem. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol ze vzorku o objemu 10 ml byl vymýván do 1 ml methanolu a ze vzorku o objemu 5 ml byl vymýván do 0,5 ml methanolu. SPE kolonka byla pro opakované použití promyta 10 ml methanolu.

### **4.3.3 HPLC stanovení koncentrace 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v mediu**

Pro stanovení aktuální koncentrace xenobiotika v mediu byla změřena kalibrační závislost 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v rozsahu 0,01 – 0,12 mg/ml (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,12). Hodnoty byly zpracovány do formy kalibrační závislosti udávající závislost plochy píku na koncentraci 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu. Naměřená kalibrační závislost byla použita pro vyhodnocení aktuální koncentrace xenobiotika ve fytoextrakčních experimentech.

Hodnota detekčního limitu byla vypočítána jako množství odpovídající trojnásobku výše šumu pozadí mezi píky (ca. 0,7 mg/l).

## **4.4 IZOLACE PRODUKTŮ BIOTRANSFORMACE 17 $\alpha$ -ETHYNYLESTRADIOLU**

### **4.4.1 Analýza rostlin**

Zmražené a zvážené rostliny byly po přidání mořského písku zhomogenizovány v třecí misce. Homogenáty byly převrstveny destilovaným ethyl-acetátem a ponechány po dobu 20 minut v ultrazvukové lázni. Ethyl-acetátová fáze byla oddělena a celý postup byl opakován třikrát. Do spojených ethyl-acetátových fází byl přidán bezvodý síran hořečnatý a vše bylo ponecháno sušit přes noc. Sušidlo bylo odfiltrováno a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. Odparek byl zmražen při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$  pro další analýzy.

Izolovaný extrakt z rostlin byl rozpuštěn v ethyl-acetátu a analyzován pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu. Jako optimální mobilní fáze byla použita

směs aceton:toluen v poměru 1:9. Detekci byla prováděna UV zářením při vlnové délce 254 nm.

#### **4.4.2 Analýza media**

Medium bylo rozmraženo a byl přidán destilovaný ethyl-acetát v poměru 25 ml destilovaného ethyl-acetátu na 100 ml média. Roztok byl zahříván k varu pod zpětným chladičem po dobu pěti minut. Po ochlazení byla v dělicí nálevce oddělena organická fáze a medium bylo extrahováno ještě jednou. Spojené organické extrakty byly sušeny síranem hořečnatým. Sušidlo bylo po 12 hodinách odfiltrováno a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. Odparek byl uložen při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$  pro další analýzy.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

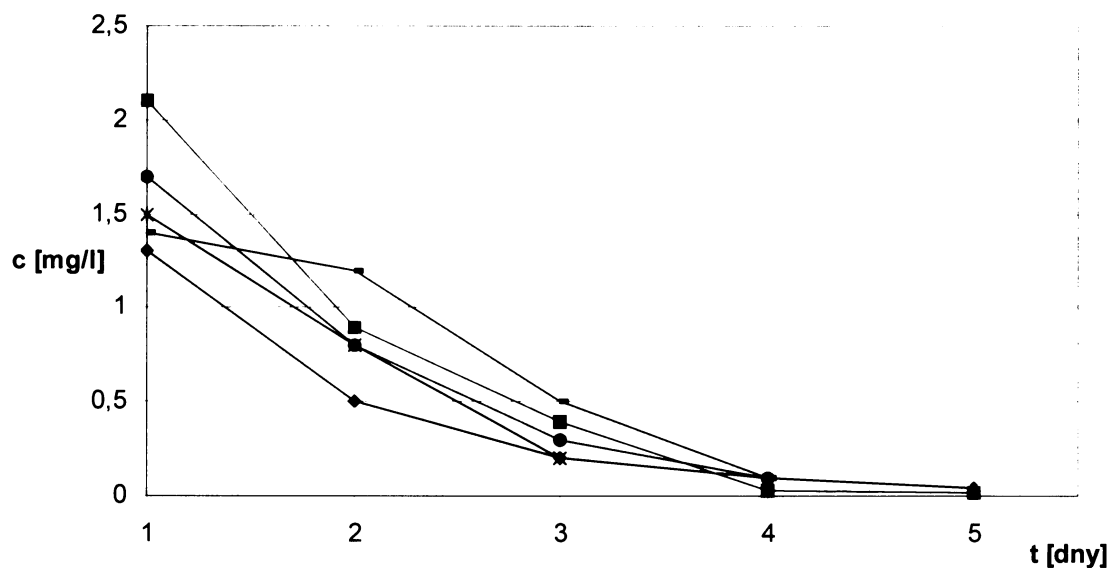
Primárním a hlavním cílem tohoto projektu bylo zjistit, zda kořenové systémy vybraných modelových organismů jsou schopny extrahovat xenobiotický substrát z media a v případě, že k tomuto jevu dochází, jak rychle a s jakou účinností fytoextrakce probíhá. V našem případě byl jako substrát použit  $17\alpha$ -ethynylestradiol.

Výsledky experimentů pro kukuřici pukancovou a pro řepku olejku prokázaly schopnost těchto rostlin extrahovat  $17\alpha$ -ethynylestradiol z media. Prokázaly také, že naměřené hodnoty pro jednotlivé rostliny se mohou více či méně lišit. Tyto odchylky jsou způsobeny individuální variabilitou jednotlivých rostlinných jedinců, proto jednotlivé odvozené hodnoty budou udávány pouze jako průměrné hodnoty vybraných rostlinných jedinců.

Řepka olejka byla testována v mediu o výchozí koncentraci  $17\alpha$ -ethynylestradiolu 5mg/l (graf 1). Ihned po přidání tohoto xenobiotika byl proveden první odběr. Zde je vidět evidentní pokles koncentrace sledované látky v mediu oproti předpokládané koncentraci. Toto snížení je patrně způsobeno malou rozpustností použitého substrátu v mediu, kdy se zřejmě část látky vysráží v mikrokrytalické formě, a sorpcí jak rozpuštěných, tak pevných částic substrátu na kořenový systém rostliny. Z původní hodnoty 5 mg/l poklesla tato koncentrace o 68 % na hodnotu 1,6 mg/l.

Z následného průběhu grafu je zřejmé, že v průběhu dalších dnů dochází k poklesu koncentrace xenobiotika. Vyobrazené křivky mají přibližně exponenciální charakter. Během prvních tří dnů experimentu je koncentrace  $17\alpha$ -ethynylestradiolu v mediu snižována přibližně na 50 % koncentrace z předchozího dne. V průběhu třetího dne již koncentrace klesá na velmi malou hodnotu, tj. okolo 0,01 mg/l. U některých kultur je tato hodnota snížena pod hranici detekčního limitu.

Bylo zjištěno, že k výrazné fytoextrakci  $17\alpha$ -ethynylestradiolu z media probíhá během prvních tří dnů. Ve vzorku odebraném ve čtvrtý den experimentu již byla naměřena hodnota pouhých 5,16 % z počátečních 1,6 mg/l, tedy 0,08 mg/l.



**Graf 1:** Časová závislost koncentrace  $17\alpha$ -ethynylestradiolu v kultivačním mediu s rostlinami řepky olejky *Brassica napus*; křivky znázorňují jednotlivé rostlinné kultury v kultivačních baňkách; výchozí koncentrace  $17\alpha$ -ethynylestradiolu v přidávaném mediu byla 5 mg/l

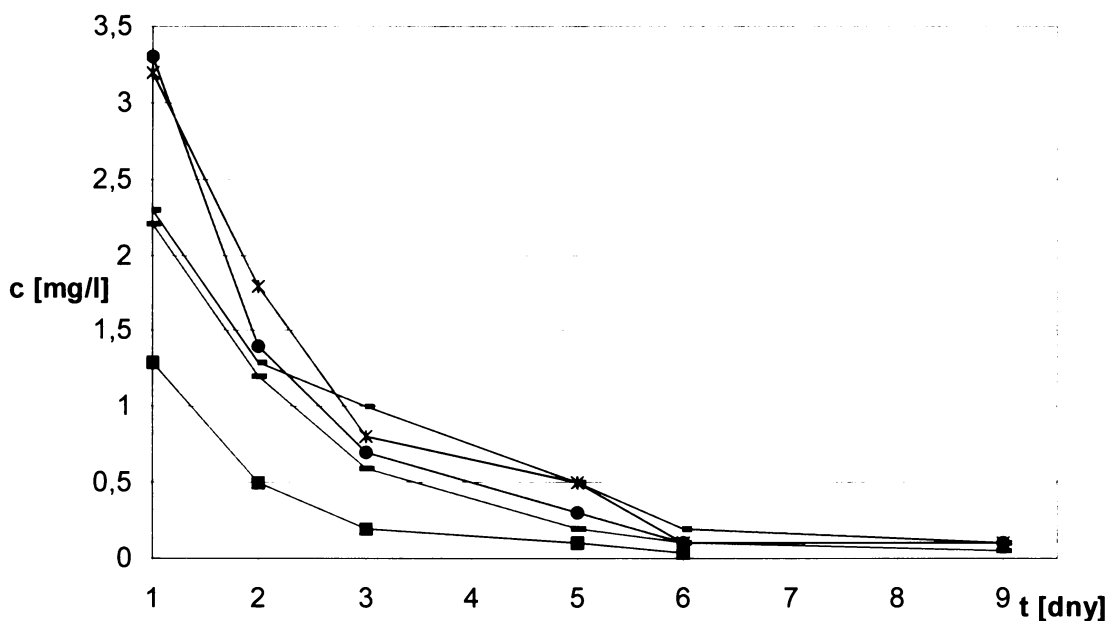
Pro získání dalších poznatků byly kultivační experimenty provedeny s jiným rostlinným druhem, kukuřicí pukancovou. Rostliny kukuřice vytvářejí podstatně větší množství biomasy a protože fytoextrakční účinnost roste s rychlostí tvorby biomasy a transpirační rychlostí, byl reálný předpoklad, že uvedená rostlinná species bude vykazovat vyšší rychlost fytoextrakce. S kukuřicí byly prováděny studie pro dvě různé koncentrace xenobiotika v mediu.

V prvním experimentu byla kukuřice studována v mediu o výchozí koncentraci  $17\alpha$ -ethynylestradiolu 5 mg/l (graf 2). Okamžitě po přidání xenobiotika byl odebrán první vzorek. Podobně jako u řepky i zde došlo ke zřetelnému poklesu koncentrace xenobiotika oproti předpokládané koncentraci. Z původní hodnoty 5 mg/l poklesla tato koncentrace o 50,8 % na hodnotu 2,46 mg/l. Ve srovnání s experimentem bez rostliny je pokles několikanásobně větší a evidentně sleduje plochu a morfologii kořenového systému.

V průběhu prvních dvou dnů je, podobně jako u řepky, hodnota koncentrace přibližně poloviční oproti koncentraci z předchozího dne. Během následujících tří dnů byl však pokles koncentrace lineární. Závislost koncentrace zkoumané látky v mediu není z hlediska koncentračního průběhu zcela triviální a nejspíše se uplatňuje jak

fytoextrakce, tak i uvolňování primárně sorbovaného xenobiotika z povrchu kořenů, nezanedbatelným není ani nárůst nových kořenů během kultivace.

Nezávisle na komplikovanosti průběhu však lze konstatovat, že většina 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu byla extrahována rostlinami kukuřice během prvních šesti dnů. Šestý den byla koncentrace xenobiotika v mediu rovna 0,11 mg/ml. To znamená pokles koncentrace o 95,6 % oproti koncentraci z prvního dne měření.



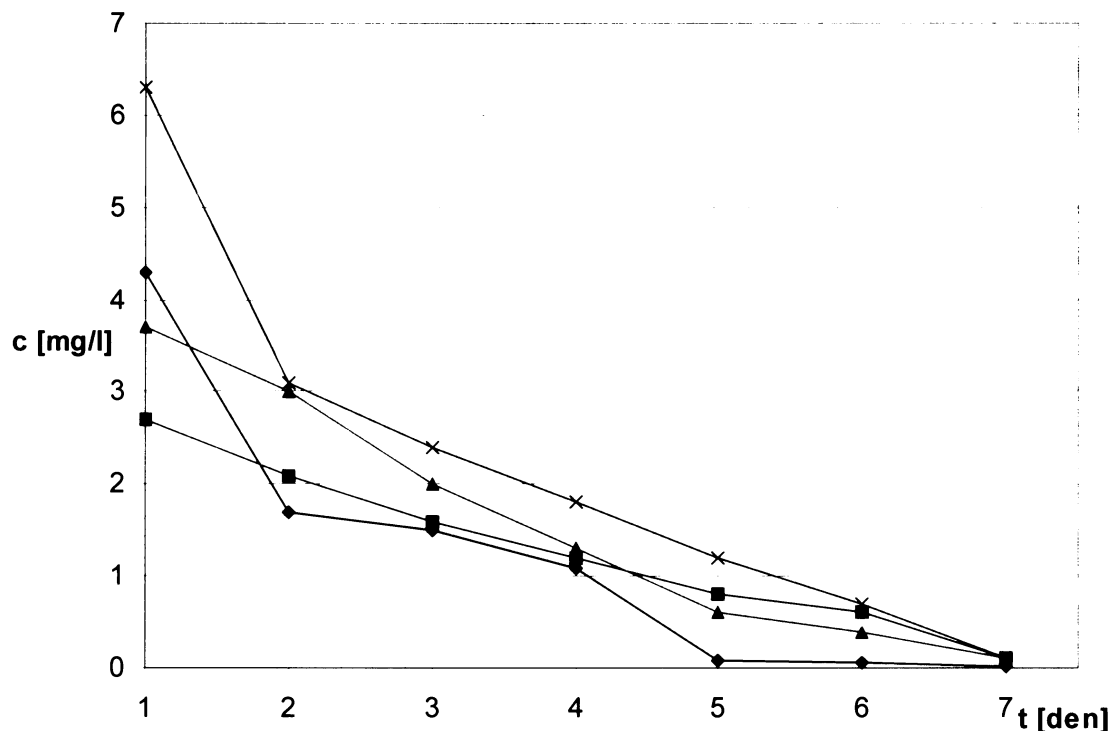
**Graf 2:** Časová závislost koncentrace 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v kulturačním mediu s rostlinami kukuřice pukancové *Zea mays sp.*; křivky znázorňují jednotlivé rostlinné kultury v kulturačních baňkách; výchozí koncentrace 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v přidávaném mediu byla 5 mg/l

V druhém experimentu byla kukuřice studována v mediu o výchozí koncentraci 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu 10 mg/l (graf 3). Bezprostředně po přidání xenobiotika zde byla znovu evidována nižší koncentrace než předpokládaná výchozí koncentrace. Z původní hodnoty poklesla tato koncentrace o 57,5 % na hodnotu 4,25 mg/l.

Během prvního dne byl zaznamenán pokles přibližně o 55 %. V následujících dnech strmost křivky klesá a dochází k lineárnímu poklesu koncentrace 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v průměru o 30 % za den. Tento pokles trvá až do sedmého dne experimentu, kdy již byla koncentrace na hranici detekčního limitu a měření bylo ukončeno.

Při posledním měření byla koncentrace snížena o 97,14 % oproti koncentraci stanovené v první den měření.

Podrobnější procentuální závislosti hodnot koncentrací ze všech tří prováděných experimentů jsou uvedeno v následující tabulce (Tab. 5).

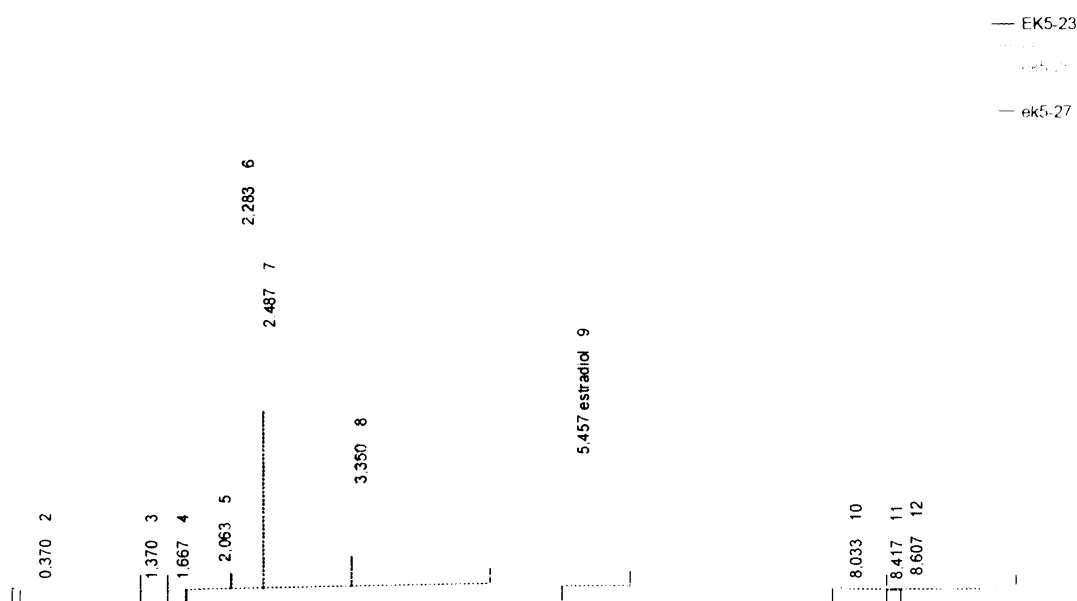


**Graf 3:** Časová závislost koncentrace 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v kultivačním mediu s rostlinami kukuřice pukancové *Zea mays sp.*; křivky znázorňují jednotlivé rostlinné kulturu v kultivačních baňkách; výchozí koncentrace 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v přidávaném mediu byla 10 mg/l

**Tab. 5:** Procentuální závislosti hodnot koncentrací; proškrtnuté kolonky značí, že v tento den nebyl realizován odběr vzorku media; kolonky s označením x značí, že daná hodnota nemohla být z logických důvodů vypočítána

den měření	pokles hodnoty koncentrace oproti předchozímu dni měření [%]			pokles hodnoty koncentrace oproti počáteční naměřené koncentraci [%]		
	5 mg/l		10 mg/l	5 mg/l		10 mg/l
	řepka	kukuřice	kukuřice	řepka	kukuřice	kukuřice
1.	x	x	x	0,0	0,0	0,0
2.	47,5	49,6	41,8	47,5	49,6	41,8
3.	61,9	46,8	24,2	80,0	73,2	55,9
4.	74,2	-----	28,0	94,8	-----	68,2
5.	63,6	51,5	37,0	96,4	87,0	80,0
6.	-----	66,3	29,4	-----	95,6	85,9
7.	-----	-----	79,2	-----	-----	97,1
9.	-----	19,0	-----	-----	96,4	-----

Získané údaje však poskytují cenné informace o sorpčním chování použité látky, která vzhledem ke svému lipofilnímu charakteru má vysokou afinitu ke kořenové tkáni. Podstatným je především fakt, že koncentrace v dalších dnech kultivace klesá až na hodnotu pod detekčním limitem. Příklad fytoextrakčního experimentu demonstruje obrázek 2, kde je zřejmý pokles signálu s retenčním časem 5,46 odpovídající standardu 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu.



**Obr. 2:** Chromatografická analýza media během fytoextrakčního experimentu s rostlinami kukuřice. Jednotlivé křivky odpovídají odběrům v různém čase (žlutá - oranžová) (podmínky separace jsou uvedeny v textu).

Z hlediska analýzy případných metabolitů či nově tvořených látek v důsledku xenobiotického stresu je zajímavý chromatogram, který identifikuje signál nově vznikající sloučeniny, který lze pozorovat pouze při kultivaci s přidaným 17 $\alpha$ -estradiolem. Signál zřejmě odpovídá produktu biotransformace. Příslušná frakce z HPLC byla analyzována hmotnostní spektrometrií. Výsledek ukazuje na přítomnost molekulárního iontu  $m/z$  338, což pro  $M + Na^+$  (ESI pos) odpovídá vnesení hydroxyly, s největší pravděpodobností na trojnou vazbu substrátu (diference  $m/z$  18 odpovídá adici vody). Přesnější identifikace vyžaduje větší množství vzorku a analýzu dalšími spektrometrickými metodami, která bude provedena v rámci navazujících studií.

TLC analýzy neukázaly výrazný rozdíl způsobený přítomností xenobiotika jak při analýze media, tak i rostlinných extraktů.

Praktickým výsledkem je rovněž zhodnocení možností předúpravy vzorku pomocí SPE. V reálných vzorcích a v reálných roztocích, kde by bylo možné použít fytoextrakci estrogenů jsou koncentrace těchto látek velmi nízké a možnosti analytických stanovení omezené. Předúprava pomocí SPE by tak mohla výrazně přispět k metodice analýz estrogenů v odpadních vodách. U SPE byly sledována výtěžnost extrakce a možnosti opakovaného použití separačních kolonek. Byly testovány rovněž dva materiály s analogickým sorbentem (C-18) a to firem Supelco a Varian. Na rozdíl od SPE kolonek Varian, kde probíhala sorpce uspokojivě, u materiálů od firmy Supelco jsme nedosáhli kýženého efektu. Pro SPE kolonky Varian Bond Elut C-18 (500 mg sorbentu) byla průměrná účinnost extrakce 88 %, rozdíly při čtyřnásobném opakovaném použití SPE kolony nepřesahovaly 1,5 relativního procenta. Detailní studie SPE extrakce 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu je však náplní jiného projektu



## 6 ZÁVĚR

Projekt byl koncipován jako pilotní studie možností odstranění látek s estrogením skeletem v modelovém systému pro odpadní vody, respektive vody opouštějící běžné čističky komunálních odpadních vod, ve kterých jsou látky s estrogením skeletem odstraňovány pouze nedostatečně. Vypracování metodiky fytoextrakce dává alespoň teoretický základ pro vytvoření technologie založené na principu bioreaktorů či mokřad, které by v závěrečné fázi čištění odpadních vod byly schopny snížit koncentraci estrogeně aktivních substancí pocházejících z masivního používání perorálních kontraceptiv. V práci byla vypracována metodika analýzy 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu ve vodných roztocích simulovaných ve formě kultivačního media. Vzhledem k předpokládaným nízkým hodnotám koncentrace studované látky byl vypracován podklad pro metodiku předpřípravy vzorku pomocí SPE, která by mohla být použitelná při rutinních analýzách. Experimenty naznačují dobrou reprodukovatelnost i účinnost procesu. Analytická metoda, založená na HPLC separaci s UV detekcí se ukázala jako reálná, zmíněná metoda předúpravy vzorku dovoluje použití UV detektoru a je zřejmě výhodnější než možnost derivatizace fluorescenčními činidly. Separační systém dovoluje jednoznačně oddělit studovanou látku od dalších komponent roztoku, což je podstatné pro vlastní aplikaci.

Vlastní fytoextrakční experimenty prokázaly schopnost kořenové extrakce studované látky z vodného prostředí. Účinnost fytoextrakce přesahovala 90 % pro obě testované rostlinné species, extrakce je navíc poměrně rychlá, což je z hlediska předpokládané technologické aplikace výhodné. Uvážíme-li, že během 24 hodin dochází k poklesu koncentrace o více než 50 %, a to ještě ve statickém uspořádání, je možnost konstrukce bioreaktoru v kontinuálním uspořádání a s řízenou distribucí toku kapaliny velmi reálná.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
DDT	dichlordiethyltrichlorethan
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
TNT	trinitrotoluen
TCE	trichlorethylen
PCE	polychlorethylen
MTBE	methyl terc.butylether
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialový
SPE	extrakce tuhou fází
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

## 8 PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady. Dále bych poděkoval Mgr. Věře Habartové a Ing. Šárce Pšondrové za všestrannou pomoc v laboratoři.

Rodině a přátelům děkuji za jejich pochopení a nesmírnou shovívavost se mnou.

## 9 LITERATURA

1. Hanč O., Pádr Z.: *Hormony : Úvod do jejich chemie a biologie*, Academia, str. 22-24, 472-491, Praha **1982**.
2. Hořejší J. a spolupracovníci: *Základy klinické biochemie ve vnitřním lékařství*, vydání 4., přepracované a doplněné, Avicenum, str. 468,469, Praha **1989**.
3. Wright S.: *Klinická fyziologie*, vydání 2., Avicenum, str. 629-632, Praha **1970**.
4. Hynie S.: *Speciální farmakologie - Díl III. - Látky ovlivňující CNS*, Karolinum, str. 121,122, Praha **2000**.
5. Hynie, S.: *Speciální farmakologie - Díl IV. - Látky ovlivňující kardiovaskulární systém* Karolinum, str. 240, Praha **2000**.
6. Hynie S.: *Speciální farmakologie - Díl VII/A. - protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky*, Karolinum, str. 88-96, Praha **2000**.
7. Hynie S.: *Speciální farmakologie - Díl VI. - Hormony a vitamíny*, Karolinum, str. 121-148, Praha **2000**.
8. *Český lékopis 1997 – Doplněk 2000*, Pharmacopoea bohemica, Grada Publishing, spol. s.r.o., str. 5389, Praha **1994, 2000**.
9. *Český lékopis 1997 – Doplněk 2000*, Pharmacopoea bohemica, Grada Publishing, spol. s.r.o., str. 5915, 5917, Praha **1994, 2000**.
10. <http://chemfinder.cambridgesoft.com> , 3.5.2006.
11. Huang Ch., Sedlak D.L.: *Envir. Tox. Chem.*, 20, 133-139, **2001**.
12. Vodrážka Z.: *Biochemie*, 2. opravené vydání, Academia, str. 175–179, Praha **2002**.
13. Sumpter J.P.: *Pure Appl. Chem.*, 75, 2335-2341, **2003**.
14. Ternes T.A., Andersen H., Gilberg D., Bonerz M.: *Anal. Chem.*, 74, 3498-3504, **2002**.
15. Kuster M., Lópéz de Alda M. J., Barceló D.: *Trends Anal. Chem.*, 23, 790-798, **2004**.
16. Kučerová P., Macková M., Macek T.: *Chem. listy*, 93, 19-26, **1999**.
17. Lai K. M., Scrimshaw M. D., Lester J.N.: *App. Envir. Microbiol.*, 68, 859-864, **2002**.
18. [http://www.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/Zahlazovani/Z07/P\\_07.htm](http://www.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/Zahlazovani/Z07/P_07.htm), 3.5.2006

19. Trends in Biotechnol., 13, 393-397, **1995**.
20. [www.cvut.cz/pracoviste/odbor-rozvoje/dokumenty/hab\\_inaug/hp/2003/hp2003-07.pdf](http://www.cvut.cz/pracoviste/odbor-rozvoje/dokumenty/hab_inaug/hp/2003/hp2003-07.pdf), 3.5.2006
21. [www.recetox.muni.cz/sources/unido\\_narodni\\_inventura\\_03/POPsINV\\_cast\\_VII\\_Kapitola\\_16\\_Biodegradace\\_PCBs.pdf](http://www.recetox.muni.cz/sources/unido_narodni_inventura_03/POPsINV_cast_VII_Kapitola_16_Biodegradace_PCBs.pdf), 3.5.2006
22. <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2004/vvf-13-04.pdf>, 3.5.2006