

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

**Anthelmintika v rostlinách – příjem,  
biotransformace a transkripční odpověď**

**Disertační práce**

Mgr. Eliška Syslová

Vedoucí disertační práce:

prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Odborný konzultant:

RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Hradec Králové 2019

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

Hradec Králové, 2019

Mgr. Eliška Syslová

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D., za odborné vedení v průběhu doktorského studia a za její trpělivost, optimismus a lidský přístup.

Veliké díky patří mé odborné konzultantce RNDr. Radce Podlipné, Ph.D. za odborné vedení, podporu a čas, který mi věnovala, za přátelský a optimistický přístup vždy po celou dobu mého doktorského studia.

Děkuji pracovnímu kolektivu Ústavu experimentální botaniky Laboratoře rostlinných biotechnologií AV ČR za přátelskou atmosféru a ochotu mi s čímkoliv pomoci.

A nakonec poděkování největší, celé mé rodině, především mým nejdražším rodičům, sourozencům a partnerovi - děkuji!

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (GAČR 15-05352S, 18-08452S).

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Kandidát** Mgr. Eliška SYSLOVÁ

**Školitel** prof. Ing. Barbora SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

**Konzultant** RNDr. Radka PODLIPNÁ, Ph.D.

Název disertační práce:

**Anthelmintika v rostlinách – příjem, biotransformace a transkripční odpověď**

Používání anthelmintik, léčiv proti parazitickým červům, je ve veterinární medicíně v dnešní době téměř nezbytné. S exkrementy ošetřených zvířat se však mohou anthelmintika dostávat do životního prostředí a tam ovlivňovat necílové organismy. Nedílnou součástí životního prostředí jsou rostliny, které tyto látky mohou přijímat, biotransformovat či akumulovat. Biotransformace anthelmintik může mít vliv na kapacitu antioxidantního systému, může zasahovat do endogenního metabolismu rostlin nebo biosyntézy polyfenolů, při které rostliny používají stejné detoxikační enzymy.

Cílem této disertační práce je studovat vliv nejběžněji používaných anthelmintik albendazolu (ABZ), fenbendazolu (FBZ), flubendazolu (FLU) a ivermektinu (IVM) na rostliny. Studovat jejich příjem rostlinou, jejich biotransformaci v rostlinách a transkripční odpověď rostlinných buněk na jejich přítomnost.

Mezi výsledky disertační práce řadíme mimo jiné zjištění, že v modelových systémech buněčných suspenzí a *in vitro* regenerantů *Plantago lanceolata* probíhají stejné typy biotransformačních reakcí, ale spektrum a množství metabolitů ABZ detekovaných v buněčných suspenzích je nižší. Jitrocel kopinatý je tedy schopný přijmout, transportovat a metabolizovat ABZ. *In vitro* regeneranty *Plantago lanceolata* jsou schopné přijímat také FLU a FBZ, translokovat je z kořene do listů a transformovat do různých metabolitů, nejčastěji glykosidů. Sledovaná anthelmintika významně zvyšují koncentraci stresového markeru prolinu a také významně snižují aktivitu enzymu superoxiddismutázy.

V *Arabidopsis thaliana* stresovaných FBZ bylo v kořenech a listech identifikováno 12 různých metabolitů, převážně produktů hydroxylace, S-oxidace a glykosylace. FBZ také významně ovlivnil expresi genů i proteinů rostlin *Arabidopsis thaliana*. Některé z proteinů jsou zapojeny do různých biologických procesů (transport elektronů, dráhy generování energie, signální transdukce, transport) a v reakci na stres (např. cytochromy P450, UDP-glykosyltransferázy, superoxiddismutáza, kataláza). Rostliny *Arabidopsis thaliana* jsou schopné kořenovým systémem přijmout i makrocyclický lakton IVM a translokovat ho do svých nadzemních částí. Přestože byla v listech nalezena zvýšená exprese genů antioxidantních enzymů, IVM nezpůsobil změny v aktivitě těchto enzymů.

Tato práce přispěla ke komplexnějšímu pohledu na rizika výskytu anthelmintik v životním prostředí.

# Abstract

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate** Mgr. Eliška SYSLOVÁ

**Supervisor** prof. Ing. Barbora SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

**Consultant** RNDr. Radka PODLIPNÁ, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

**Anthelmintics in Plants – Uptake, Biotransformation and Transcriptional Response**

The use of anthelmintics, drugs against parasitic worms, is almost necessary in veterinary medicine today. However, anthelmintics may enter the environment with the excrements of treated animals, and influence non-target organisms there. Plants which can receive, biotransform or accumulate these substances, are an integral part of the environment. Biotransformation of anthelmintics may affect the capacity of the antioxidant system, interfere with endogenous plant metabolism or polyphenol biosynthesis where plants use the same detoxifying enzymes.

The aim of this thesis is to study the influence of the most commonly used anthelmintics albendazole (ABZ), fenbendazole (FBZ), flubendazole (FLU) and ivermectin (IVM) on plants. To study their uptake by plants, their biotransformation in plants and transcriptional response of plant cells to their presence.

The results of the dissertation include the finding that model systems of cell suspensions and in vitro regenerants of *Plantago lanceolata* catalyze the same types of biotransformation reactions, but the spectrum and amount of ABZ metabolites detected in cell suspensions is lower. Thus, the ribwort plantain is able to uptake, transport and metabolize ABZ. *Plantago lanceolata* in vitro regenerants are also able to uptake FLU and FBZ, translocate them from the root to the leaves and transform them into various metabolites, most often glycosides. The studied anthelmintics significantly increase the

concentration of the stress marker proline and also significantly reduce the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase.

In *Arabidopsis thaliana* plants stressed by FBZ, 12 different metabolites were identified in the roots and leaves, predominantly products of hydroxylation, S-oxidation and glycosylation. FBZ also significantly influenced the expression of genes and proteins of *Arabidopsis thaliana* plants. Some of the proteins are involved in various biological processes (electron transport, energy generation pathways, signal transduction, transport) and in response to stress (eg cytochromes P450, UDP-glycosyltransferases, superoxide dismutase, catalase). *Arabidopsis thaliana* plants are able to uptake the macrocyclic lactone IVM through the root system and translocate it to their above-ground parts. Although IVM did not induce changes in the activity of antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana* rosettes, the expression of their genes was significantly affected.

This work contributed to a more comprehensive view of the risks of anthelmintics in the environment.

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| <b>Abstrakt</b> .....  | 4  |
| <b>Abstract</b> .....  | 6  |
| <b>Obsah</b> .....   | 8  |
| <b>Úvod</b> .....  | 10 |
| <b>Teoretická část</b> .....   | 11 |
| 1.1 Veterinární léčiva v životním prostředí.....   | 11 |
| 1.2 Anthelmintika.....   | 12 |
| 1.2.1 Benzimidazoly - albendazol, fenbendazol, flubendazol.....  | 12 |
| 1.2.2 Makrocyclické laktony – ivermektin.....  | 14 |
| 1.3 Fytoremediace.....   | 15 |
| 1.4 Biotransformace.....   | 15 |
| 1.4.1 Enzymy metabolizující xenobiotika.....   | 16 |
| 1.4.2 Transport xenobiotik.....  | 19 |
| 1.5 Biotransformace veterinárních léčiv v rostlinách.....  | 20 |
| 1.6 Modelové rostliny.....   | 22 |
| <b>Cíle práce</b> .....  | 23 |
| <b>Komentáře k publikacím</b> .....  | 24 |
| 1.7 Hodnocení příjmu a deaktivace léčiva v rostlině: Osud albendazolu v buňkách a regenerantech jitrocele kopinatého ( <i>Plantago lanceolata</i> )..... | 24 |
| 1.8 Biotransformace flubendazolu a fenbendazolu a jejich účinky na jitrocel kopinatý ( <i>Plantago lanceolata</i> ).....                                 | 26 |
| 1.9 Metabolismus anthelmintika fenbendazolu v <i>Arabidopsis thaliana</i> a jeho vliv na transkriptom a proteom.....                                     | 27 |
| 1.10 Biotransformace ivermektinu a dopad na transkripci v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 28 |
| <b>Závěry</b> .....  | 29 |
| <b>Podíl předkladatelky na publikacích zahrnutých v disertační práci</b> .....   | 31 |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>Seznam použité literatury.....</b>                                   | <b>32</b> |
| <b>Přílohy – publikace vztahující se k tématu disertační práce.....</b> | <b>40</b> |
| <b>Seznam všech publikací.....</b>                                      | <b>41</b> |
| <b>Seznam prezentací na vědeckých setkáních.....</b>                    | <b>42</b> |
| <b>Seznam zkratk.....</b>   | <b>43</b> |

# Úvod

V současné době jsou nedílnou součástí chovu zvířat a ochranou jejich zdraví i léky. Anthelmintika jsou ve veterinární medicíně hodně využívána k terapii a profylaxi infekčních onemocnění způsobených parazitickými červy – helminty. Pro léčené organismy jsou nepochybně prospěšná, ale mohou způsobovat problémy v ekosystémech, kam se dostávají různými cestami – přímo močí a exkrementy léčených hospodářských zvířat nebo nepřímo prosakováním z kontaminovaného hnoje do povrchových a podzemních vod. V životním prostředí se z důvodu rostoucího použití neustále zvyšuje množství léčiv obecně, nejen anthelmintik a jejich metabolitů. Proto pro životní prostředí představují veliké riziko. O koncentraci anthelmintik v životním prostředí stále nemáme dostatečné informace. Jednotlivé léky a jejich metabolity nepůsobí v prostředí samostatně, ale jako chemický koktejl, v komplexu s dalšími kontaminanty. Mají tak veliký vliv nejen na vodu a půdu, ale i na necílové organismy (bezobratlé, vodní živočichy) (Bártíková et al., 2016). Mohou mít nežádoucí až škodlivé účinky na organismy, které využívají stolici nebo s ní přicházejí do kontaktu (McKellar, 1997). Mezi tyto „necílové organismy“ můžeme zařadit i rostliny, protože jsou nedílnou součástí životního prostředí. Dostatečné informace o metabolismu a účinku anthelmintik v rostlinách stále chybí.

Znalost osudu anthelmintik a jejich vlivu na rostliny je nezbytná pro jejich bezpečné použití ve vztahu k životnímu prostředí. Tato práce je součástí rozsáhlého projektu, který se na několika rostlinných druzích (*Plantago lanceolata*, *Campanula rotundifolia*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*) snaží získat informace o anthelmintikách v rostlinách, jejich metabolických přeměnách a účastnících se enzymech. Náplní této disertační práce je studium metabolismu anthelmintik v jitroceli kopinatém (*Plantago lanceolata*) a huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), studium vlivu anthelmintik na metabolismus rostlin na molekulární úrovni (aktivita enzymů, změny v proteomu) a studium transkripční odpovědi buněk rostlin na přítomnost léčiv. Znalosti metabolických drah anthelmintik a zúčastněných enzymů v rostlinách nám umožňují, abychom vyhodnotili dopad anthelmintik v prostředí na rostlinné organismy. Jednotlivé výsledky projektu přispívají ke komplexnějšímu pohledu na rizika výskytu anthelmintik v ekosystému.

# Teoretická část

## 1.1 Veterinární léčiva v životním prostředí

Veterinární léčiva se v dnešní době používají k léčbě nemocí a ochraně zdraví zvířat zcela běžně. Do životního prostředí se mohou dostat různými cestami. Nejčastěji jde o vylučování léků nebo jejich metabolitů v moči a stolici ošetřených zvířat. Léčivo může být vyloučeno jako parentní látka, jako bioaktivní metabolit odpovědný za terapeutický nebo vedlejší účinek, nebo jako neaktivní metabolit, který může být zpět přeměněn na léčivo původní (Bártíková et al., 2016).

Již několik studií zkoumalo toxický efekt léčiv na vodní druhy (řasy, fytoplankton, ryby) i na půdní prostředí (mikroorganismy, hmyz, žížaly) (Wagil et al., 2015, Baguer et al., 2000). Ale informace o fytotoxicitě veterinárních léků nejsou žádné nebo jsou nedostatečné.

Mezi nejpoužívanější farmakologické kategorie veterinárních léčiv patří antibiotika a antiparazitika (Kools et al., 2008).

Antibiotika jsou léčiva zabíjející mikroorganismy nebo inhibující jejich růst či metabolickou aktivitu biochemickými účinky. Používají se k ochraně zdraví zvířat velkochovů a k prevenci ekonomických ztrát. Mnoho antibiotik se ze zažívacího traktu zvířat vstřebává špatně a většina podané dávky je vyloučena stolicí. V hnoji, půdě i povrchových a podzemních vodách se tak vyskytují léčiva jen nepatrně transformovaná či dokonce nezměněná. Díky hnojení kontaminovaným hnojem jsou antibiotika distribuována do životního prostředí, tam mohou být zachycena rostlinami a v rostlinných tkáních se hromadit (Bártíková et al., 2016). Fytotoxicita veterinárních antibiotik závisí na druhu rostliny i typu antibiotické sloučeniny. U většiny provedených experimentů *in vitro* byla použita koncentrace antibiotik nepravděpodobná v půdě (Jjemba, 2002).

Několik studií bylo zaměřeno na tetracykliny. Ve skleníkové studii s chlortetracyklinem bylo prokázáno, že kukuřice (*Zea mays*), zelená cibule (*Allium cepa*) a zelí (*Brassica oleracea var. capitata*) pěstované v půdě ošetřené hnojem, absorbovalo antibiotikum v hnoji přítomné. Chlortetracyklin byl také absorbován pšenicí (*Triticum aestivum*) pěstovanou na půdě hnojené tekutým hnojivem od prasat

léčených chlortetracyklinem, sulfadiazinem a trimethoprimem (Kumar et al., 2005, Grote et al., 2007).

Další hodně studovanou skupinou antibiotik jsou sulfonamidy. Pšenice (*Triticum aestivum*) pěstovaná na půdě hnojené hnojem od medikovaných prasat, obsahovala sulfadiazin především v kořenech, stopy byly detekovány v listech a stoncích. Při pokusech s hydroponickými kulturami, sulfadiazin zachycený kořeny pšenice dosáhl čtyřikrát až pětkrát vyšší koncentrace, než byla koncentrace stanovena v polních experimentech. Vychytávání sulfadiazinu bylo potvrzeno i hydroponickými kulturami mrkve (*Daucus carota*) a salátu (*Valerianella locusta*) (Grote et al., 2007).

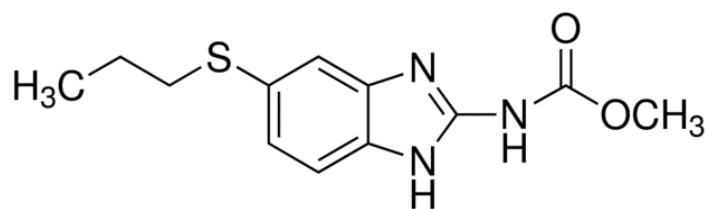
Antiparazitika obecně dělíme na ektoparazitika, pro kontrolu vnějších parazitů, a endoparazitika, která se používají proti parazitům vnitřním (anthelmintika, antiprotozoika, antikokcidika).

Ektoparazitika nejsou obecně považována za toxická pro rostliny (EMA, 2004). Studie zabývající se účinkem diazinonu, fipronilu a lambdacyhalothrinu neprokázala toxicitu u rýže (*Oryza sativa*) (Moore a Kroger, 2010). I přes rozsáhlé používání antiprotozoik a antikokcidik jsou údaje o jejich dopadu na životní prostředí vzácné. Jako autorizované antikokcidiální doplňkové látky, se nejčastěji používají ionoforová antibiotika. Jejich rozšířená aplikace může podporovat odolnost protozoí, což vede ke snížené profylaktické účinnosti (Olejnik et al., 2013). Při správném používání léku halofuginonu nebyly pozorovány žádné závažné příznaky fytotoxicity (FDA, 1991).

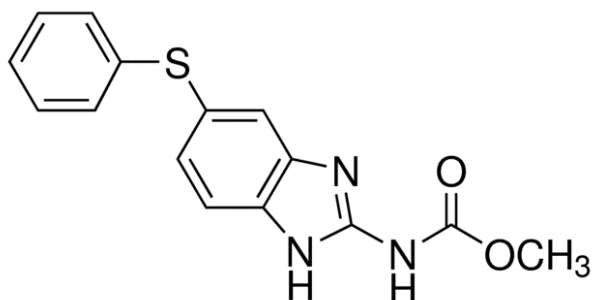
## 1.2 Anthelmintika

### 1.2.1 Benzimidazoly - albendazol, fenbendazol, flubendazol

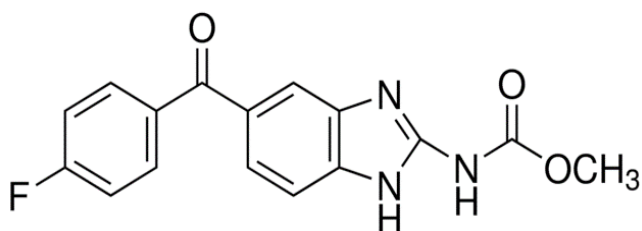
Jde o nejrozsáhlejší skupinu širokospektrých anthelmintik (obr. 1-3). Mechanismus účinku spočívá v inhibici  $\beta$ -tubulinových podjednotek sloužících pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů a tím narušení funkčnosti celé parazitární buňky. Po perorálním podání mají velmi rozdílné vstřebání z gastrointestinálního traktu.



Obr. 1. Albendazol, ABZ, systematickým názvem methyl-[5-(propylsulfanyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát.



Obr. 2. Fenbendazol, FEN, systematickým názvem methyl-5-(fenylthio)-2-benzimidazolkarbamát.



Obr. 3. Flubendazol, FLU, systematickým názvem methyl-N-[6-(4-fluorbenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát.

ABZ se široce používá nejen ve veterinární medicíně, ale i v medicíně humánní, proti parazitům intestinálním i systémovým (Danaher et al., 2006). Podléhá rychlému metabolismu v játrech, kde probíhá přeměna na sulfoxid a sulfon. FLU a FEN se používají ve veterinární medicíně proti nematodám, tasemnicím i motolicím. Především u prasat, kuřat, krůt a domácích masožravců (Bártíková et al., 2010).

Negativní efekt bezimidazolových anthelmintik na životní prostředí i na vodní organismy byl popsán již několikrát (Wagil et al., 2015; Bundschuh et al., 2016). Nebyl pozorován žádný nepříznivý efekt FLU a FEN na růst *Lemna minor* (Wagil et al.,

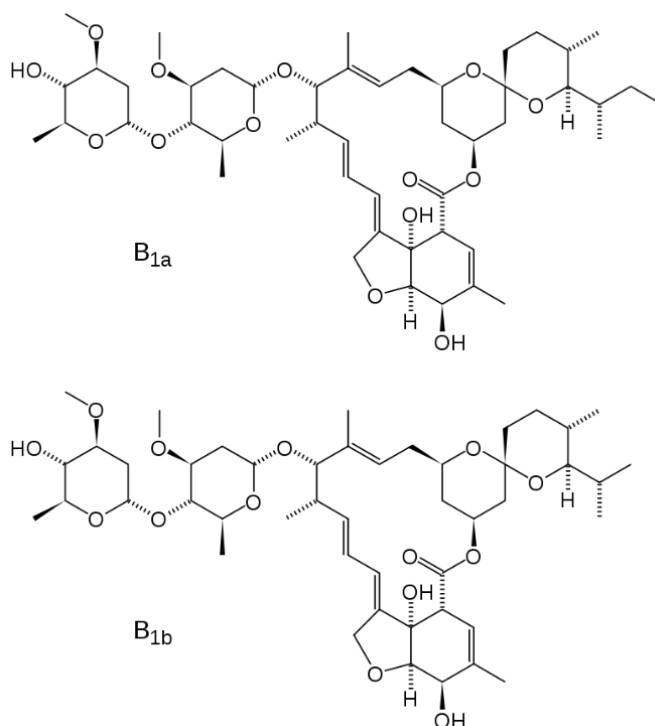
2015). Benzimidazolová antihelmintika ABZ, FLU a FBZ nebyla shledána jako toxická pro buňky zvonku okrouhlolistého (*Campanula rotundifolia*). Při chronické expozici se toxický vliv vyloučit nedá (Stuchlíková et al., 2016).

## 1.2.2 Makrocyclické laktony – ivermektin

Jde o semisyntetický derivát avermektinu, makrocyclického laktonu produkovanému *Streptomyces avermitilis*. IVM (obr. 4) se používá především jako antinematodum, lék proti oblým červům a hlísticím, a jako ektoparazitikum, lék proti členovcům. Působí proti vývojovým i dospělým stádiím. IVM je silně lipofilní, ve vodě téměř nerozpustný, špatně proniká hematoencefalickou bariérou (Lumaret et al., 2012).

Mechanismus účinku začíná vazbou na glutamát-chloridové kanály na postsynaptických membránách nervových a svalových buněk. To způsobuje nadměrný přísun chloridových iontů a následuje paralýza a smrt parazita.

Ve studiích s avermektiny nebyla pozorována žádná fytotoxicita (Halley et al., 1993; Kolodziejska et al., 2013). S exkrementy ošetřených zvířat se IVM může dostat do půdy, v 62-98% v nezměněné formě (Horvat et al., 2012). Lipidová vrstva na povrchu listů rostlin poskytuje prostor pro akumulaci IVM (Iglesias et al., 2018). Vysoká akumulace IVM byla nalezena v kořenech *Salvinia biloba* (Mesa et al., 2017).



Obr. 4. Ivermektin, 22,23-dihydroavermektin B<sub>1a</sub> a 22,23-dihydroavermektin B<sub>1b</sub>.

### 1.3 Fytoremediace

Znečištění půdy a znečištění pevniny je hlavním problémem na světě. Zvyšování produkce průmyslu, zemědělství a likvidace odpadu vedly k rozsáhlé kontaminaci půdy a vody organickými sloučeninami a těžkými kovy, což má škodlivé účinky na ekosystémy a lidské zdraví (Furini et al. 2015, Sharma, Pathak 2014).

Bioremediace a fytoremediace jsou dvě důležité techniky, které lze použít k rekultivaci znečištěné půdy a vody. Remediací = náprava, znamená řešení problému a bio-remediací znamená k tomuto řešení použít biologických organismů. Fytoremediace představuje bioremediaci pomocí rostlin. Je to metoda, která používá rostliny a související mikroorganismy rhizosféry k odstranění, transformaci, metabolizaci nebo detoxikaci polutantů životního prostředí. V současné době se používá fytoremediace k odstranění mnoha tříd kontaminantů včetně ropných uhlovodíků, chlorovaných rozpouštědel, pesticidů, výbušnin, těžkých kovů a radionuklidů. V mnoha sanačních projektech je fytoremediace považována za poslední krok po počáteční kontaminaci na vysoké úrovni (Susarla et al. 2002). Rostliny s fytoremediačním potenciálem se pěstují v místech znečištěné půdy. Tyto rostliny jsou schopné stimulovat biologickou degradaci znečišťujících látek v půdě. Fytoremediace je levný a ekologický proces čištění životního prostředí, trvá ale několik let (Sharma, Pathak 2014).

Fytoremediační aplikace lze klasifikovat na základě osudu kontaminantu: degradace, extrakce, zadržování nebo jejich kombinace. Lze je také klasifikovat na základě příslušných mechanismů. Tyto mechanismy zahrnují extrakci kontaminantů z půdy nebo podzemních vod; koncentrace kontaminantů v rostlinné tkáni; degradace kontaminantů různými biotickými nebo abiotickými procesy; těkavost nebo transpirace těkavých kontaminantů z rostlin do vzduchu; imobilizace kontaminantů v kořenové zóně; kontrola odtoku, eroze a infiltrace vegetativními kryty (Sharma, Pathak 2014). Studium biotransformačních enzymů je důležité pro výběr vhodných genů pro případné zvýšení fytoremediačního potenciálu rostlin pomocí genetických manipulací.

### 1.4 Biotransformace

Rostliny, které jsou v kontaktu s anthelmintiky, mohou být schopny vylučovat a transformovat xenobiotika na méně nebo i více toxické sloučeniny působením speciálních enzymů metabolizujících léky nebo enzymů z endogenního metabolismu.

Vzniklé metabolity mohou skladovat ve vakuolách nebo buněčných stěnách. Anthelmintikum v rostlině může způsobit změny ve funkci / expresi enzymu vedoucí ke změnám ve fyziologii rostlin.

Pro biotransformaci xenobiotik u vyšších rostlin platí podobné principy jako u lidí a zvířat. Jednotlivé fáze odbourávání, transformace a konjugace, se prakticky neliší. Biotransformace anthelmintik a dalších xenobiotik v rostlinách probíhá ve třech fázích. Během první fáze biotransformace jsou do struktury xenobiotika zabudovávány reaktivní a hydrofilní skupiny během oxidace, redukce a hydrolýzy. Během fáze druhé, xenobiotikum nebo jeho metabolit vzniklý v první fázi, podléhá konjugačním reakcím s endogenními sloučeninami. U rostlin nejčastěji s glutathionem nebo sacharidy. Během fáze třetí jsou metabolity nebo konjugáty xenobiotika transportovány do vakuol nebo buněčných stěn pomocí různých mechanismů a transportérů (Bártíková et al., 2015, Halling-Sorensen et al., 2012).

#### **1.4.1 Enzymy metabolizující xenobiotika**

Enzymy metabolizující xenobiotika, tj. transportní proteiny a biotransformační enzymy, mají velký význam v obraně před potenciálně nebezpečnými látkami. Biotransformační enzymy mění chemickou strukturu xenobiotika s cílem omezit jeho interakci s biomakromolekulami a urychlit jeho eliminaci. Vzniklý metabolit je většinou hydrofilnější než parentní látka. Bývá také lépe rozeznatelný pro transportní systémy, čímž většinou dochází k urychlení eliminace.

Cytochromy P450 (CYP), hemoproteiny všudypřítomné v živých organismech, jsou nejdůležitější zúčastněné enzymy I. fáze metabolismu xenobiotik. CYP váží vzdušný kyslík a katalyzují štěpení O-O vazby molekul kyslíku a vkládají jeden atom kyslíku do molekuly substrátu, druhý je zabudován do molekuly vody. Tato reakce se používá pro detoxikaci xenobiotik a také pro biosyntézu mnoha endogenních sloučenin (Hamdane et al., 2008). CYP tvoří jednu z největších nadrodin rostlinných proteinů. Byly identifikovány tisíce různých CYP a klasifikovány do několika rodin a podrodin na základě sekvenční homologie genů (Morant et al., 2003; Nelson & Werck-Reichhart, 2011). CYP obvykle katalyzují monooxygenaci (včetně hydroxylace, epoxidace, dealkylace, dekarboxylace a izomerizace) substrátů, ale jsou také schopny reagovat jako peroxidázy nebo reduktázy. Všechny tyto reakce jsou nutné pro syntézu rozmanitých přírodních rostlinných produktů a také hrají velmi důležitou roli v metabolismu xenobiotik (Morant et al., 2003).



Peroxidázy představují další důležité enzymy účastníci se I. fáze metabolismu xenobiotik v rostlinách. Tyto proteiny se širokou strukturální rozmanitostí, katalyzují redoxní reakce mezi peroxidem vodíku a různými substráty. Peroxidázy se podílejí na mnoha rostlinných buněčných procesech (vývoj, stresové reakce). Na základě rozdílů v primární struktuře, superrodinu peroxidáz lze rozdělit do tří tříd: I, II a III. Peroxidázy třídy I (také známé jako askorbátperoxidázy) jsou intracelulární enzymy v rostlinách, bakteriích a kvasinkách. Třída II jsou převážně extracelulární fungální peroxidázy, zatímco peroxidázy třídy III se vyskytují pouze u vyšších rostlin, které jsou definovány jako sekreční peroxidázy (Jouili et al., 2011).

Askorbátperoxidázy (třída I), katalyzující konverzi  $H_2O_2$  na  $H_2O$  pomocí askorbátu jako specifického donoru elektronů, hrají klíčovou roli v cyklu askorbát - glutathion, což je hlavní detoxikační systém peroxidu vodíku v rostlinných buňkách. Odlišné izoformy askorbátperoxidáz jsou přítomny v různých subcelulárních kompartmentech (chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, cytosol) a jejich exprese je regulována v reakci na stres i během vývoje rostlin. Askorbátperoxidázy se přímo podílejí na ochraně rostlinných buněk proti nepříznivým podmínkám prostředí, ale pravděpodobně se neúčastní biotransformace xenobiotik. Zajímavé je, že fungální peroxidázy třídy II jsou schopny oxidovat řadu různých organických znečišťujících látek (Caverzan et al., 2012; Dabrowska et al., 2007).

Peroxidázy třídy III jsou běžné peroxidázy vyšších rostlin. Jsou definovány jako sekreční peroxidázy (Jouili et al., 2011). Vykazují schopnost oxidovat mnoho xenobiotik. Jejich struktura se skládá ze dvou domén s hem-prostetickou skupinou umístěnou ve štěrbině mezi nimi (Jansen et al., 2004). Peroxidázy třídy III jsou glykoproteiny, které katalyzují oxidace fenolů, aromatických aminů, indolů a sulfátů peroxidem vodíku a příbuznými oxidanty. Předpokládá se také, že mohou iniciovat transformaci cizích sloučenin na buněčném povrchu před jejich vstupem do buněk (Chasov et al., 2010).

Rostlinný metabolismus využívá také řady reduktáz. Aldo-keto reduktázy jsou početnou nadrodinou enzymů metabolizujících aldehydy a ketony endogenního, ale i exogenního původu. Jejich exprese může vzrůstat i při abiotickém stresu způsobeném teplotou, suchem nebo osmotickým stresem (Kanayama 2014).

Hydrolázy katalyzují hydrolýzu xenobiotických esterů za vzniku látek s hydrofilními funkčními skupinami. Nejčastějšími hydrolázami rostlin jsou

karboxyesterázy. V genomu huseníčku rolního jsou zastoupeny 460 geny (Skálová a kol. 2011).

Do II. fáze metabolismu xenobiotik řadíme konjugační reakce, kdy dochází ke konjugaci xenobiotika s endogenní molekulou a ke zvýšení hydrofility xenobiotika. U rostlin mohou být xenobiotika konjugována se sacharidy, glutathionem, kyselinou malonovou a s aminokyselinami. K nejdůležitějším reakcím patří konjugace xenobiotik s glutathionem. Reakce jsou zprostředkovány především enzymy, které patří do nadrodiny glutathion-S-transferáz (GST). Nadrodina GST v rostlinách byla rozdělena do osmi tříd, z nichž sedm je cytosolických a jedna mikrosomální. GST jsou nezbytné v růstu a vývoji rostlin. Většina GST jsou aktivní jako dimery, vykonávající různé katalytické i nekatalytické role v detoxikaci xenobiotik, v prevenci oxidačního poškození a endogenního metabolismu. GST katalyzují především nukleofilní konjugaci redukované formy tripeptidu glutathionu na širokou škálu hydrofobních, elektrofilních a obvykle cytotoxických substrátů (Frova, 2003). Rostlinné GST přitahovaly pozornost zejména kvůli jejich roli v toleranci vůči herbicidům (Oztetik, 2008). Tau-třídy GST, specifické pro rostliny, se podílejí na metabolismu herbicidů. Několik studií ukázalo že nejenom herbicidy, ale i jiná xenobiotika jsou metabolizována Tau-třídou GST v různých druzích rostlin (Basantani et al., 2011).

UDP-glykosyltransferázy (UGT) se nacházejí v celé rostlinné a živočišné říši. V rostlinách jsou velmi hojné, např. 96 různých genů UGT bylo identifikováno v *Cicer arietinum* (Sharma et al., 2014). UGT zprostředkovávají přenos sacharidu z aktivovaných nukleotidových cukrů na akceptorové molekuly (aglykony) (Ross et al., 2001). Savčí enzymy používají kyselinu UDP-glukuronovou, rostlinné enzymy obvykle používají UDP-glukózu (Meech et al., 2012; Rowland et al., 2013). Rozmanitá xenobiotika včetně rostlinných hormonů a sekundárních metabolitů zapojených do stresových a obranných reakcí mohou být v rostlinách glykosylována UGT. Spousta xenobiotik s různými strukturami jsou substráty UGT. Glykosylace reguluje mnoho vlastností aglykonů (biologická aktivita, rozpustnost, transportní vlastnosti v buňce a v celé rostlině) (Li et al., 2001; Simon et al., 2014). UGT proto hrají klíčovou roli v metabolismu sekundárních rostlinných metabolitů a také v detoxikaci xenobiotik jako např. organochloridů z odpadních vod (San Miguel et al., 2013). Benzimidazolová anthelmintika byla deaktivována u *Phragmites australis* tvorbou glukosidů (Podlípna et

al., 2013). Některé UGT mohou deaktivovat určité mykotoxiny a zvýšená exprese těchto UGT může zlepšit ochranu rostlin (Ma et al., 2010; Shin et al., 2012).

Sulfotransferázy představují proteinovou rodinu, která používá fosfoadenosin-5-fosfosulfát jako sulfurylového dárce a přenáší sulfátovou skupinu na vhodné hydroxylové skupiny několika tříd substrátů. Sulfotransferázy se nachází v eubakteriích i eukaryotech. U savců se podílejí na metabolismu mnoha xenobiotik a eobiotik včetně steroidních hormonů a neurotransmiterů. U rostlin se sulfatace účastní intermolekulárního rozpoznávání a signálních procesů a zdá se, že hrají důležitou roli v růstu rostlin, vývoji a adaptaci na stres. Rostlinné substráty pro sulfataci zahrnují glukosinoláty, brassinosteroidy, jasmonáty, flavonoidy a kyselinu salicylovou (Hirschmann et al., 2014; Klein & Papenbrock, 2004; Varin et al., 1997). Bylo identifikováno několik rostlinných sulfotransferáz, ale pouze několik z nich bylo podrobně charakterizováno. Plně sekvenovaný genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje celkem 21 genů, které pravděpodobně kódují proteiny sulfotransferáz (Hirschmann et al., 2014). Jeden z nich byl charakterizován jako protein, který katalyzuje sulfataci 12-hydroxyjasmonátu a tím inaktivuje nadbytek kyseliny jasmonové v rostlinách (Klein & Papenbrock, 2004).

#### **1.4.2 Transport xenobiotik**

Mnoho xenobiotik, metabolitů a konjugátů není schopno projít lipidovou membránou. Z tohoto důvodu musí být transportovány pomocí specifických transportních proteinů. Tyto proteiny byly rozsáhle studovány na bakteriích, kvasinkách a savčích buňkách díky velkému klinickému významu. V rostlinných systémech dobře prostudovány nejsou, ačkoli rostlinné genomy obsahují velké množství genů kódujících domnělé transportéry léků. Transportéry léčiv mají obvykle široké substrátové specifity a mohou transportovat strukturálně rozmanité sloučeniny. Rostlinné lékové transportéry jsou zapojeny při transportu celé řady endogenních sloučenin (auxinů, flavonoidů, glutathionových konjugátů a chelátorů kovů) (Conte & Lloyd, 2011). Dvě proteinové nadrodiny přepravují široké spektrum organických látek, jsou to ABC-transportéry a MATE-transportéry (Nuruzzaman et al., 2014).

ABC (ATP Binding Cassette) transportéry patří k jedné z největších rodin proteinů, které jsou zapojeny do detoxikačních procesů. Členy této rodiny jsou velké glykoproteiny složené ze dvou transmembránových domén a dvou domén vázajících nukleotid. Nadrodina ABC byla rozdělena na několik rodin a podrodin s velmi

odlišnými funkcemi. *Arabidopsis thaliana* obsahuje více než sto ABC transportérů účastnících se metabolismu xenobiotik, biosyntézy chlorofylu, tvorby Fe / S klastrů, stomatálních pohybů, růstu rostlin a vývojových procesů (Martinoia et al., 2002). Protože mnoho ABC transportérů významně reguluje transport a skladování xenobiotik a jejich metabolitů v rostlinách, mají velký potenciál stát se užitečnou pomocí strategie fytoremediace (Conte & Lloyd, 2011).

Transportéry MATE (multidrug and toxin extrusion protein) jsou sekundární aktivní transportéry, které zajišťují transport substrátu, jejich hnací silou je elektrochemický gradient na membráně. Jde o nově charakterizovanou rodinu transportérů s omezenou znalostí funkcí v rostlinách. MATE transportéry se podílejí na detoxikaci kovů a metabolismu fenolů jejich vezikulárním skladováním nebo vytlačováním na plazmatickou membránu. MATE představují mechanismy, které udržují homeostázu skrz vylučování metabolických odpadních produktů a xenobiotik (He et al., 2010; Moriyama et al., 2008; Tiwari et al., 2014). Výsledky funkční studie ukazují, že MATE regulují růst rostlin a vývoj a také negativně ovlivňují odolnost proti chorobám (Tiwari et al., 2014). Byly charakterizovány MATE1 a MATE2 členové. Přes jejich vysokou podobnost se oba transportéry liší v selektivitě substrátu (Zhao et al., 2011).

## 1.5 Biotransformace veterinárních léčiv v rostlinách

Příjem léčiva rostlinou automaticky neznamená způsob detoxikace léčiva v prostředí. Léčivo může být v rostlinách uskladňováno. Existuje určité riziko, že zužitkovávání rostlin obsahujících léčiva by mohlo ovlivnit bezobratlé nebo jiná zvířata. Pouze biotransformace léčiv na netoxické a stabilní metabolity a jejich následná akumulace v rostlinách představují možné způsoby detoxikace léčiv. Léčivo či jeho metabolity mohou být dokonce toxičtější než původní sloučeniny. Některé netoxické lékové konjugáty (např. glykosidy) jsou nestabilní a snadno podléhají hydrolýze působením mikroorganismů nebo v trávicím traktu zvířat (Laurent et al., 2007). Z tohoto důvodu znalost biotransformačních cest každého léčiva v rostlinách a testování biologických aktivit metabolitů léčiv je velmi důležitá. Přesto ve skutečnosti byla studována biotransformace léčiv v rostlinách jen zřídka.

Přestože antibiotika patří k nejdůležitějším a nejpoužívanějším veterinárním léčivům, informace o jejich biotransformaci v rostlinách jsou omezené. Fytotoxicita,

absorpce a biotransformace enrofloxacinu byly studovány na kulturách rostlin *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* a *Raphanus sativus*. Výsledky ukázaly, že rostliny byly schopny metabolizovat enrofloxacin na ciprofloxacin reakcí deetylace (Migliore et al., 2003). Ve skleníkovém experimentu s vrbou (*Salix fragilis*) a kukuřicí (*Zea mays*) byly rostliny pěstovány po dobu 40 dnů v půdě obohacené sulfonamidovým antibiotikem sulfadiazinem. Parentní látka a dva hlavní metabolity, 4-hydroxysulfadiazin a N-acetylsulfadiazin byly akumulované v rostlinných tkáních (Michelini et al., 2012).

Fytotoxicita a biotransformace antibiotika chlortetracyklinu byla zkoumána u fazolí pinto (*Phaseolus vulgaris*) a kukuřice (*Zea mays*). Při pěstování v chlortetracyklinem ošetřené půdě bylo zaznamenáno významné zvýšení aktivity rostlinných GST a peroxidázy u kukuřice, ale ne u pinto fazolí. GST u kukuřice *in vitro* katalyzoval konjugaci glutathionu s chlortetracyklinem, ale GST extrahovaný z pinto fazolí tuto reakci katalyzoval neúčinně. Tyto výsledky naznačují, že kukuřice je schopna detoxikovat chlortetracyklin cestou konjugace s glutathionem, zatímco fazole pinto tuto reakci nekatalyzuje. To může vysvětlit pozorovaný zakrnělý růst pinto fazole po léčbě antibiotiky (Farkas et al., 2007). GST zprostředkovaná biotransformace může být důležitým detoxikačním způsobem i pro jiná antibiotika (tetracyklin, sulfathiazol a ampicilin), hlavní léky vyskytující se v odpadních vodách. Použitím čistých GST byla tato antibiotika přeměněna na glutathionové konjugáty, které jsou netoxické pro mikroorganismy, které čistí odpadní vody (Park & Choung, 2007).

Biotransformace dvou veterinárních antihelmintik (ABZ, FLU) byla studována u rákosí (*Phragmites australis*) *in vitro*. Bylo identifikováno deset metabolitů ABZ a pět metabolitů FLU. S-oxidace a N-glukosidace představovala hlavní biotransformační reakci ABZ. Zatímco první krok S-oxidace vede k tvorbě biologicky aktivního ABZ sulfoxidu, N-glukosidaci lze považovat za detoxikaci ABZ (Podlipná et al., 2013). N-glukosidace a redukce karbonylové skupiny byly hlavní metabolické cesty biotransformace FLU. Na rozdíl od ABZ, biotransformační reakce FLU vedly k deaktivaci parentní látky, vzniklé metabolity jsou pro hlísty mnohem méně toxické než FLU (Bártíková et al., 2010). Byl identifikován jeden atypický FLU metabolit, FLU-acetylglukosid. To naznačuje, že O-acetylace glukosidů xenobiotik mohou být v rostlinných buňkách relativně běžné. Acetylglukosid 2,4-dichlorfenolu (organická znečišťující látka) byl nalezen v buněčné suspenzi tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Laurent

et al., 2007). Žádné informace o enzymech katalyzujících O-acetylaci xenobiotik v rostlinách nejsou k dispozici.

Buňky zvonku okrouhlostého (*Campanula rotundifolia*) transformovaly ABZ na 24, FLU na 18 a FBZ na 29 metabolitů. Hlavními reakcemi I. fáze biotransformace byly oxidace, hydroxylace, redukce karbonylu a hydrolýza. Ve fázi II bylo v buňkách zvonku vytvořeno mnoho různých konjugátů – glukosidů, acetylglukosidů a glukosylglukosidů. Hlavními metabolity FLU byly redukovaný FLU a N-glukosidy. Hlavními metabolity ABZ byly ABZ sulfon, ABZ sulfoxid a N-glukosid (Stuchlíková et al., 2016). Většinu těchto metabolitů lze považovat za deaktivující produkty anthelmintik, ale řada zůstává biologicky aktivní. Navíc konjugáty mohou být snadno rozloženy zpět na biologicky aktivní látky, které by mohly negativně ovlivnit ekosystémy.

## 1.6 Modelové rostliny

Jako modelové rostliny byly vybrány huseníček rolní a jitrocel kopinatý.

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*, *Brassicaceae*) je jednou z nejčastěji používaných modelových rostlin v experimentální botanice. Díky znalosti jejích genových funkcí a kódovaných proteinů, nám umožňuje studium metabolických procesů v rostlinách obecně (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*, *Plantaginaceae*) je u nás běžně rostoucí luční rostlina. Byla vybrána pro její snadný kontakt s ošetřovanými živočichy, a tedy možností setkat se s anthelmintiky.

## Cíle práce

Hlavním cílem mého doktorského studia bylo sledování vlivu vybraných anthelmintik na metabolismus rostlin na molekulární úrovni a zároveň studium transkripční odpovědi rostlinných buněk na jejich přítomnost a vyhodnocení jejich fytotoxického působení.

Mezi dílčí cíle patřilo:

- Studovat biotransformaci anthelmintik na buněčných suspenzích a sledovat vliv na tento modelový systém.
- Získané poznatky využít při studiu příjmu, translokace, akumulace a biotransformace ABZ, FLU a FBZ rostlinami *Plantago lanceolata* a vyhodnotit jejich fytotoxické působení.
- Studovat biotransformaci FBZ a jeho vliv na transkriptom a proteom *Arabidopsis thaliana*.
- Studovat biotransformaci IVM a jeho vliv na transkriptom a proteom *Arabidopsis thaliana*.
- Charakterizovat enzymy účastnící se biotransformace anthelmintik u *Plantago lanceolata* a *Arabidopsis thaliana*.

## Komentáře k publikacím

### 1.7 Hodnocení příjmu a deaktivace léčiva v rostlině: Osud albendazolu v buňkách a regenerantech jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*)

Raisová Stuchlíková, L., Podlipná, R., Szotáková, B., Syslová, E., Skálová, L.: Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, vol. 141, s. 37-42.

ABZ je benzimidazolové anthelmintikum široce používané zejména ve veterinární medicíně. Spolu s dalšími léčivy se také anthelmintika stala jednou z nové třídy mikropolutantů, které narušují životní prostředí, ale informace o jejich osudu v rostlinách zůstávají omezené.

Zaměřili jsme se na studium vychytávání a biotransformace ABZ na rostlině *Plantago lanceolata*. Jitrocel kopinatý je na loukách a pastvinách hojně rozšířená vytrvalá rostlina. Může tedy snadno přijít do kontaktu s exkrementy ošetřovaných zvířat, a tedy s ABZ nebo jeho metabolity.

Studie probíhala na dvou modelových systémech, *in vitro* na buněčných suspenzích a také *in vitro* na celých rostlinách pěstovaných za sterilních podmínek. Buněčné suspenze byly inkubovány v médiu s 10  $\mu$ M ABZ po dobu 1 týdne. *In vitro* rostlinné regeneranty byly kultivovány v agarovém médiu s 10  $\mu$ M ABZ po dobu 1, 3 a 6 týdnů a byly zde sledovány časově závislé změny ve výskytu ABZ a jeho metabolitů v kořenech, bazálních částech listů a vrcholech listů.

Buněčné suspenze byly vhodné pouze pro kvalitativní hodnocení metabolismu. V obou modelových systémech byly pozorovány stejné typy biotransformačních reakcí ABZ, ale spektrum a množství metabolitů ABZ detekovaných v buněčných suspenzích a regenerantech se významně lišily. *In vitro* regeneranty se ukázaly jako vhodný model pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení příjmu léčiv a metabolismu v rostlinách.

Pomocí UHPLC-MS/MS bylo v jitroceli kopinatém identifikováno 18 metabolitů ABZ. Většina z nich může být považována za deaktivací produkty metabolismu, ale



některé z metabolitů mohou být snadno transformovány zpět na biologicky aktivní sloučeninu.

Jitrocel kopinatý je schopný vychytávat a metabolizovat ABZ.

## 1.8 Biotransformace flubendazolu a fenbendazolu a jejich účinky na jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*)

Raisová Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., Syslová, E., Vokřál, I., Vaněk, T., Podlípna, R.: Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2018**, vol. 147, s. 681-687.

Cílem naší další studie bylo identifikovat metabolické dráhy dvou široce používaných benzimidazolových anthelmintik FLU a FBZ na rostlině *Plantago lanceolata*. Rovněž byly studovány účinky uvedených anthelmintik a jejich biotransformačních produktů na parametry oxidativního stresu rostlin.

Jako modelový systém byly použity *in vitro* rostlinné regeneranty a buněčné kultury. Rostliny byly stresovány 10  $\mu$ M roztokem anthelmintika po dobu 1, 3 a 6 týdnů.

Jitrocel kopinatý je schopný vychytávat FLU i FBZ, přemístit je z kořene do listů a transformovat do různých metabolitů, nejčastěji glykosidů. Bylo identifikováno 11 metabolitů FLU a 22 metabolitů FBZ. Většina metabolitů FLU i FBZ může být zpět přeměněna na biologicky aktivní parentní sloučeninu.

FLU i FBZ významně zvyšují koncentraci stresového markeru prolinu, přestože na rostlinách nebyly viditelné známky stresu. FLU i FBZ také významně snižují aktivitu enzymu superoxidodismutázy (o 50%). Kromě toho byly významně změněny aktivity čtyř dalších antioxidačních enzymů po expozici FLU nebo FBZ.

Výsledky mohou poukazovat na možné riziko oxidativního poškození rostlin anthelmintiky a na snížení antioxidační ochrany, zejména pokud jsou v dalších stresových podmínkách. FLU i FBZ mohou mít negativní dopad na životní prostředí.

## 1.9 Metabolismus anthelmintika fenbendazolu v *Arabidopsis thaliana* a jeho vliv na transkriptom a proteom

Syslová, E., Landa, P., Raisová Stuchlíková, L., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Navrátilova, M., Vaněk, T., Podlipná, R.: Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in *Arabidopsis thaliana* and its effect on transcriptome and proteome. *Chemosphere*, **2019**, vol. 218, 662-669.

FBZ, širokospektré anthelmintikum používané zejména ve veterinární medicíně, může mít vliv na necílové organismy v životním prostředí. Přesto jsou informace o účincích fenbendazolu na rostliny a životní prostředí omezené.

Ve studii jsme se zabývali biotransformací FBZ, vlivem FBZ i jeho metabolitů na genovou a proteinovou expresi na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Byly použity hydroponické kultury, které byly vystaveny 5  $\mu$ M FBZ po dobu 24 a 72 hodin.

Pomocí UHPLC-MS/MS techniky bylo celkem identifikováno 12 různých metabolitů v kořenech a listech, kdy jako hlavní biotransformační dráha byla identifikována hydroxylace, S-oxidace a glykosylace.

FBZ významně ovlivnil expresi genů i proteinů rostlin *Arabidopsis thaliana*. RNA-microarray analýzou spolu s ověřením qPCR bylo zjištěno, že expozice FBZ vedla k větším transkripčním změnám v listech než v kořenech. Bylo up-regulováno 104 a 10 a down-regulováno 64 a 20 transkriptů v kořenech po 24 h a 72 h stresu. V listech byla u 193 a 393 genů transkripce zvýšena a u 272 a 403 genů snížena po 24 h a 72 h stresu.

FBZ ovlivnil expresi proteinů více v kořenech po 24 h a v listech po 72 h stresu. Proteiny, u kterých byla prokázána zvýšená exprese ( $>2$ násobné změny,  $p < 0,1$ ) jsou zapojeny do různých biologických procesů (transport elektronů, dráhy generování energie, signální transdukce, transport) a v reakci na stres (např. cytochromy P450, UDP-glykosyltransferázy, superoxid dismutáza, kataláza). Některé z proteinů, které byly po expozici FBZ up-regulovány, se pravděpodobně účastní biotransformace FBZ (např. cytochromy P450, UDP-glukosyltransferázy).

FBZ výrazně ovlivňuje mnohé fyziologické i metabolické procesy v rostlinách, a proto by měla být omezena kontaminace ekosystémů hnojem obsahujícím toto anthelmintikum.

## 1.10 Biotransformace ivermektinu a dopad na transkripci v *Arabidopsis thaliana*

Syslová, E., Landa, P., Navrátilová, M., Raisová Stuchlíková, L., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Vaněk, T., Podlipná, R.: Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, **2019**, vol. 234, 528-535.

Makrocyclický lakton IVM je dnes jedno z nejpoužívanějších anthelmintik. IVM je silně lipofilní, ve vodě téměř nerozpustný a má vysokou afinitu k organické hmotě. Proto se předpokládá jeho akumulace v prostředí. Je vysoce toxický pro necílové druhy jako jsou vodní a půdní bezobratlí.

Studie se zabývala biotransformací IVM v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* a vlivem IVM nebo jeho metabolitů fyziologické procesy *Arabidopsis thaliana*. Rostliny byly stresovány 5  $\mu$ M IVM po dobu 24 a 72 hodin.

Rostliny jsou schopné přijmout IVM kořeny a přemístit ho do svých nadzemních částí. V kořenech bylo pomocí UHPLC-MS/MS techniky identifikováno 6 metabolitů IVM, v listech pouze parentní látka. Metabolity byly tvořeny pouze hydroxylací a demethylací. Nebyla detekována žádná konjugační reakce IVM.

IVM významně dysreguluje transkripci 236 genů v kořenech po 24 h a 114 genů po 72 h. Větší množství transkriptů bylo dysregulováno v listech, a to 300 genů po 24 h a 438 genů po 72 h stresu. Přestože byla nalezena zvýšená exprese genů, IVM nezpůsobil změny v aktivitě antioxidantních enzymů v rozetách *Arabidopsis thaliana*.

IVM může negativně ovlivňovat celou fyziologii rostlin, pravděpodobně porušením iontové homeostázy způsobené určitými ionoforovými vlastnostmi IVM. Významně ovlivňuje transkripci genů zodpovědných za odpovědi na osmotický stres, přesolení, ztrátu vody a obranu proti patogenům. Naše výsledky zdůraznily negativní dopad přítomnosti IVM v životním prostředí.

## Závěry

V disertační práci jsem se zabývala nejčastěji používanými anthelmintiky a jejich vlivem na metabolismus rostlin na molekulární úrovni. Studovala jsem změny v proteomu a transkripční odpovědi rostlinných buněk na přítomnost anthelmintik a jejich fytotoxický efekt.

Na základě vytyčených cílů mohu dosažené výsledky shrnout takto:

- V modelových systémech buněčných suspenzí a *in vitro* regenerantů *Plantago lanceolata* byly pozorovány stejné typy biotransformačních reakcí, ale spektrum a množství metabolitů ABZ detekovaných v buněčných suspenzích bylo nižší. V *in vitro* regenerantech *Plantago lanceolata* bylo pomocí UHPLC-MS/MS identifikováno 18 metabolitů ABZ v kořenech i v listech. Jitrocel kopinatý je tedy schopný přijmout, transportovat a metabolizovat ABZ.
- *In vitro* regeneranty *Plantago lanceolata* jsou schopné přijímat FLU i FBZ, translokovat je z kořene do listů a transformovat do různých metabolitů, nejčastěji glykosidů. Bylo identifikováno 11 metabolitů FLU a 22 metabolitů FBZ. Obě anthelmintika významně zvyšují koncentraci stresového markeru prolinu a také významně snižují aktivitu enzymu superoxiddismutázy.
- V *Arabidopsis thaliana* stresovaných FBZ bylo v kořenech a listech identifikováno 12 různých metabolitů, převážně produktů hydroxylace, S-oxidace a glykosylace. FBZ také významně ovlivnil expresi genů i proteinů rostlin *Arabidopsis thaliana*, expresi proteinů v kořenech více po 24 h a v listech po 72 h stresu. Některé z proteinů jsou zapojeny do různých biologických procesů (transport elektronů, dráhy generování energie, signální transdukce, transport) a v reakci na stres (např. cytochromy P450, UDP-glykosyltransferázy, superoxiddismutáza, kataláza).
- Rostliny *Arabidopsis thaliana* jsou schopné přijmout IVM kořeny a přemístit ho do svých nadzemních částí. V kořenech bylo identifikováno 6 metabolitů IVM, v listech pouze parentní látka. IVM významně dysreguluje transkripci genů v kořenech i v listech. Přestože byla v listech nalezena zvýšená exprese genů antioxidantních enzymů, IVM nezpůsobil změny v aktivitě těchto enzymů.

- Charakterizovali jsme základní enzymy účastnící se biotransformace anthelmintik u *Plantago lanceolata* a *Arabidopsis thaliana*. Mezi ně patří cytochromy P450, UDP-glukosyltransferázy.

Výsledky práce poukazují na případné riziko oxidativního poškození rostlin anthelmintiky a na snížení jejich antioxidační ochrany. Anthelmintika také mohou negativně ovlivňovat mnohé fyziologické i metabolické procesy v rostlinách, to je významný důvod pro omezování kontaminace ekosystémů nejen hnojem obsahujícím tato léčiva.

Celá práce zdůrazňuje negativní dopad přítomnosti anthelmintik v životním prostředí.

## Podíl předkladatelky na publikacích zahrnutých v disertační práci

Raisová Stuchlíková, L., Podlipná, R., Szotáková, B., **Syslová, E.**, Skálová, L.: Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2017**, vol. 141, s. 37-42.

- podíl na literární rešerši

Raisová Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., **Syslová, E.**, Vokřál, I., Vaněk, T., Podlipná, R.: Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2018**, vol. 147, s. 681-687.

- stanovení enzymových aktivit

**Syslová, E.**, Landa, P., Raisová Stuchlíková, L., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Navrátilová, M., Vaněk, T., Podlipná, R.: Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in *Arabidopsis thaliana* and its effect on transcriptome and proteome. *Chemosphere*, **2019**, vol. 218, 662-669.

- kultivace rostlinného materiálu
- stresování rostlin
- analýza na mikročipech
- podíl na sepsání publikace

**Syslová, E.**, Landa, P., Navrátilová, M., Raisová Stuchlíková, L., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Vaněk, T., Podlipná, R.: Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, **2019**, vol. 234, 528-535.

- kultivace rostlinného materiálu
- stresování rostlin
- analýza na mikročipech
- podíl na sepsání publikace



## Seznam použité literatury

Arabidopsis Genome Initiative Nature 408 (6814) (2000) 796–815.

Baguer, A.J., Jensen, J., Krogh, P.H. (2000). Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere* 40 (7), 751-757.

Bártíková, H., et al. (2015). Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug metabolism reviews*, 47, 3.

Bártíková, H., Křížová, V., Lamka, J., Kubíček, V., Skálová, L., Szotáková, B. (2010). Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 33, 56-62.

Bártíková, H., Podlipná, R., Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* 144, 2290-2301.

Bártíková, H., Vokřál, I., Skálová, L., Kubíček, V., Fírbasová, J., Briestenský, D., Lamka, J., Szotáková, B. (2012). The activity of drug-metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 139, 809–818.

Basantani, M., Srivastava, A. (2007). Plant glutathione transferases – A decade falls short. *Canadian Journal of Botany* 85, 443–456.

Bundschuh, M., Hahn, T., Ehrlich, B., Hölting, S., Kreuzig, R., Schulz, R. (2016). Acute Toxicity and Environmental Risks of Five Veterinary Pharmaceuticals for Aquatic Macroinvertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 96, 139-143.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B. et al. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35, 1011–1019.

- Conte, S.S., Lloyd, A.M. (2011). Exploring multiple drug and herbicide resistance in plants-Spotlight on transporter proteins. *Plant Science* 180, 196–203.
- Dabrowska, G., Katai, A., Goc, A. et al. (2007). Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta biologica Cracoviensia. Series botanica* 49, 7–17.
- Danaher, M., Howells, L.C., Crooks, S.R., Cerkvėnik-Flajs, V., O'Keeffe, M. (2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices.. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 844, 175-203.
- EMA, 2004. Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II. CVMP/VICH/790/03-FINAL. European Medicines Agency, pp. 1-39.
- Farkas, M.H., Berry, J.O., Aga, D.S. (2007). Chlortetracycline detoxification in maize via induction of glutathione S-transferases after antibiotic exposure. *Environmental Science & Technology* 41, 1450–1456.
- FDA, 1991. Environmental Assessment Report on Halofuginone Hydrobromide for Use in Replacement Cage Laying Chickens (Up to 20 Weeks of Age) and Replacement Broiler Breeders (Up to 16 Weeks of Age) Retrieved 26 March, 2015, from. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/EnvironmentalAssessments/UCM072146.pdf>.
- Frova, C. (2003). The plant glutathione transferase gene family: Genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum* 119, 469–479.
- Furini, A., Manar, A., Dalcorso, A. (2015). Editorial: Environmental phytoremediation: plants and microorganisms at work. *Frontiers in plant science* 6, 520.
- Grote, M., Schwake-Anduschus, C., Michel, R. et al. (2007). Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Landbauforschung Volkenrode* 57, 25–32.
- Halley, B.A., VandenHeuvel, W.J., Wislocki, P.G. (1993). Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Veterinary Parasitology* 48, 109-125.

- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 263-271.
- Hamdane, D., Zhang, H.M., Hollenberg, P. (2008). Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynthesis Research* 98, 657–666.
- He, X.A., Szewczyk, P., Karyakin, A., et al. (2010). Structure of a cationbound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* 467, 991–994.
- Hirschmann, F., Krause, F., Papenbrock, J. (2014). The multi-protein family of sulfotransferases in plants: Composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Frontiers in Plant Science* 5, 556.
- Horvat, A.J.M., Petrovic, M., Babic, S., Pavlovic, D.M., Asperger, D., Pelko, S., Mance, A.D., Kastelan-Macan, M. (2012). Analysis, Occurrence and Fate of Anthelmintics and their Transformation Products in the Environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 31, 61-84.
- Chasov, A.V., Alekseeva, V.Y., Kolesnikov, O.P., Minibayeva, F.V. (2010). Activation of extracellular peroxidase of wheat roots under the action of xenobiotics. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46, 431–437.
- Iglesias, L.E., Saumell, C., Sagüés, F., Sallovitz, J.M., Lifschitz, A.L. (2018). Ivermectin dissipation and movement from feces to soil under field conditions. *Journal of Environmental Science and Health* 53, 42-48.
- Jansen, M.A.K., Hill, L.M., Thorneley, R.N.F. (2004). A novel stressacclimation response in *Spirodela punctata* (Lemnaceae): 2,4,6- Trichlorophenol triggers an increase in the level of an extracellular peroxidase, capable of the oxidative dechlorination of this xenobiotic pollutant. *Plant, Cell & Environment* 27, 603–613.
- Jjemba, P.K. (2002). The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 93, 267-278.

- Jouili, H., Bouazizi, H., El Ferjani, E. (2011). Plant peroxidases: Biomarkers of metallic stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 2075–2082.
- Kanayama, Y., Mizutani, R., Yaguchi, S., Hojo, A., Ikeda, H., Nishiyama, M., Kanahama, K. (2014). Characterization of an uncharacterized aldo-keto reductase gene from peach and its role in abiotic stress tolerance. *Phytochemistry* 104, 30-36.
- Klein, M., Papenbrock, J. (2004). The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species. *Journal of Experimental Botany* 55, 1809–1820.
- Kolodziejska, M., Maszkowska, J., Bialk-Bielinska, A., Steudte, S., Kumirska, J., Stepnowski, P., Stolte, S. (2013). Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere* 92 (9), 1253-1259.
- Kools, S.A., Moltmann, J.F., Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory, Toxicology and Pharmacology* 50 (1), 59-65.
- Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, S.K. et al. (2005). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality* 34, 2082–2085.
- Laurent, F., Canlet, C., Debrauwer, L., Pascal-Lorber, S. (2007). Metabolic fate of C-14 -2,4-dichlorophenol in tobacco cell suspension cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2299–2307.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.K., Bowles, D.J. (2001). Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4338–4343.
- Lumaret, J.P., Errouissi, F., Floate, K., Römbke, J., Wardhaugh, K. (2012). A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments 13, 1004-1060.
- Ma, L.L., Shang, Y., Cao, A.Z. et al. (2010). Molecular cloning and characterization of an up-regulated UDP-glucosyltransferase gene induced by DON from *Triticum aestivum* L. cv. Wangshuibai. *Molecular Biology Reports* 37, 785–795.

- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M. et al. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters – More than just detoxifiers. *Planta* 214, 345–355.
- McKellar, Q.A. 1997. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary parasitology* 72, 413-426.
- Meech, R., Miners, J.O., Lewis, B.C., Mackenzie, P.I. (2012). The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: Versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & Therapeutics* 134, 200–218.
- Mesa, L.M., Lindt, I., Negro, L., Gutierrez, M.F., Mayora, G., Montalto, L., Ballent, M., Lifschitz, A. (2017). Aquatic toxicity of ivermectin in cattle dung assessed using microcosms. *Ecotoxicology and environmental safety* 144, 422-429.
- Migliore, L., Cozzolino, S., Fiori, M. (2003). Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 52, 1233–1244.
- Michelini, L., Reichel, R., Werner, W. et al. (2012). Sulfadiazine uptake and effects on *Salix fragilis* L. and *Zea mays* L. plants. *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 5243–5257.
- Moore, M.T., Kroger, R. (2010). Effect of three insecticides and two herbicides on rice (*Oryza sativa*) seedling germination and growth. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59 (4), 574-581.
- Morant, M., Bak, S., Moller, B.L., Werck-Reichhart, D. (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 151–162.
- Moriyama, Y., Hiasa, M., Matsumoto, T., Omote, H. (2008). Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica* 38, 1107–1118.
- Nelson, D., Werck-Reichhart, D. (2011). A P450-centric view of plant evolution. *Plant Journal* 66, 194–211.
- Nuruzzaman, M., Zhang, R., Cao, H.Z., Luo, Z.Y. (2014). Plant pleiotropic drug resistance transporters: Transport mechanism, gene expression, and function. *Journal of Integrative Plant Biology* 56, 729–740.

- Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. (2013). The determination of six ionophore coccidiostats in feed by liquid chromatography with postcolumn derivatisation and spectrophotometric/fluorescence detection. *The Scientific World Journal* 2013.
- Oztetik, E. (2008). A tale of plant glutathione S-transferases: Since 1970. *Botanical Review* 74, 419–437.
- Park, H., Choung, Y.K. (2007). Degradation of antibiotics (tetracycline, sulfathiazole, ampicillin) using enzymes of glutathione S-transferase. *Human and Ecological Risk Assessment* 13, 1147–1155.
- Podlipná, R., Skálová, L., Seidlová, H. et al. (2013). Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technol* 144, 216–224.
- Podlipná, R., Skálová, L., Seidlová, H., Szotáková, B., Kubíček, V., Jirásko, R., Vaněk, T., Vokřál, I. (2013). Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology* 144, 216-224.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E.K., Bowles, D.J. (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology* 2, 1–6.
- Rowland, A., Miners, J.O., Mackenzie, P.I. (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45, 1121–1132.
- San Miguel, A., Schroder, P., Harpaintner, R. et al. (2013). Response of phase II detoxification enzymes in *Phragmites australis* plants exposed to organochlorines. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 3464–3471.
- Sharma, R., Rawat, V., Suresh, C.G. (2014). Genome-wide identification and tissue-specific expression analysis of UDP-glycosyltransferases genes confirm their abundance in *Cicer arietinum* (Chickpea) genome. *PLoS One* 9, 109715.

- Sharma, S., Pathak, H. (2014). Basis techniques of phytoremediation. International Journal of Scientific & Engineering Research 5 (4), 584-605.
- Shin, S., Torres-Acosta, J.A., Heinen, S.J. et al. (2012). Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a barley UDP-glucosyltransferase exhibit resistance to the mycotoxin deoxynivalenol. Journal of Experimental Botany 63, 4731–4740.
- Simon, C., Langlois-Meurinne, M., Didierlaurent, L. et al. (2014). The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are components of redox status in resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Plant, Cell & Environment 37, 1114–1129.
- Skálová, L., Boušová, I., Podlipná, R., a kol. (2011). Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum.
- Stuchlíková, L., Jirásko, R., Skálová, L., Pavlík, F., Szotáková, B., Holčapek, M., Podlipná, R. (2016). Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*). Chemosphere 157, 10-17.
- Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organoc chemical contamination. Ecological Engineering 18, 647-658.
- Tiwari, M., Sharma, D., Singh, M. et al. (2014). Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in *Arabidopsis*. Sci Rep 4:3964.
- Varin, L., Marsolais, F., Richard, M., Rouleau, M. (1997). Biochemistry and molecular biology of plant sulfotransferases. FASEB Journal 11, 517–525.
- Wagil, M., Białk-Bielińska, A., Puckowski, A., Wychodnik, K., Maszkowska, J., Mulkiewicz, E., Kumirska, J., Stepnowski, P., Stolte, S., 2015. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. Environmental Science and Pollution Research 22, 2566-2573.
- Zhao, J., Huhman, D., Shadle, G. et al. (2011). MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula*. Plant Cell 23, 1536–1555.

## **Přílohy – publikace vztahující se k tématu disertační práce**

1. Raisová Stuchlíková, L., Podlipná, R., Szotáková, B., **Syslová, E.**, Skálová, L.: Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2017**, vol. 141, s. 37-42.
2. Raisová Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., **Syslová, E.**, Vokřál, I., Vaněk, T., Podlipná R.: Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2018**, vol. 147, s. 681-687.
3. **Syslová, E.**, Landa, P., Navrátilová, M., Stuchlíková, L.R., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Vaněk, T., Podlipná, R.: Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, **2019**, vol. 234, 528-535.
4. **Syslová, E.**, Landa, P., Stuchlíková, L.R., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Navrátilová, M., Vaněk, T., Podlipná, R.: Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in *Arabidopsis thaliana* and its effect on transcriptome and proteome. *Chemosphere*, **2019**, vol. 218, 662-669.



## Seznam všech publikací

Raisová Stuchlíková, L., Podlipná, R., Szotáková, B., **Syslová, E.**, Skálová, L.: Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2017**, vol. 141, s. 37-42.

IF 3,15

Raisová Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., **Syslová, E.**, Vokřál, I., Vaněk, T., Podlipná, R.: Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2018**, vol. 147, s. 681-687.

IF 2,46

**Syslová, E.**, Landa, P., Stuchlíková, L.R., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Navrátilová, M., Vaněk, T., Podlipná, R.: Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in *Arabidopsis thaliana* and its effect on transcriptome and proteome. *Chemosphere*, **2019**, vol. 218, 662-669.

IF 5,108

**Syslová, E.**, Landa, P., Navrátilová, M., Stuchlíková, L.R., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., Vaněk, T., Podlipná, R.: Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, **2019**, vol. 234, 528-535.

IF 5,108

## Seznam prezentací na vědeckých setkáních

Syslová, E., Podlipná, R., Szotáková, B. Effects of anthelmintic on a model plant (*Arabidopsis thaliana*). International Ceplas Summer School „Emerging Frontiers in Plant Sciences“, Německo, **2017**

Syslová, E., Podlipná, R., Szotáková, B. Anthelmintics in plants - the effect on enzyme activities. XXIX. Xenobiochemické symposium, Telč, **2017**

Syslová, E., Podlipná, R., Harant, K. Anthelmintics in plants - Changes in plant proteome. 14th Student Conference of Experimental Plant Biology, Bratislava, Slovensko, **2017**

Syslová, E., Podlipná, R., Landa, P., Szotáková, B. Anthelmintics in plants – the effect on transcriptome. TOXCON, Slovensko, **2018**

Syslová, E., Podlipná, R., Landa, P., Szotáková, B. Anthelmintics in plants. 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové, **2019**

Syslová, E., Podlipná, R., Landa, P., Szotáková, B. Anthelmintics in plants. Transatlantic Summer School 2019 Frontiers in Plant Sciences, Německo, **2019**

## Seznam zkratek

|      |                                       |
|------|---------------------------------------|
| ABC  | ATP Binding Casette                   |
| ABZ  | albendazol                            |
| CYP  | cytochrom P450                        |
| FBZ  | fenbendazol                           |
| FLU  | flubendazol                           |
| GST  | glutathion-S-transferáza              |
| IVM  | ivermektin                            |
| MATE | multidrug and toxin extrusion protein |
| UGT  | UDP-glykosyltransferáza               |