

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**MODULÁCIA EXPRESIE A AKTIVITY VYBRANÝCH DETOXIKAČNÝCH
ENZÝMOV RASTLÍN ANTHELMINTIKAMI**

Diplomová práca

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

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Patrícia Graňáková

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

„Čestne vyhlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v texte riadne citované.“

V Hradci Králové 14.5.2019

Patricia Graňáková

POĎAKOVANIE

Ďakujem prof. Ing. Barbore Szotákovej, Ph.D. za vedenie a konzultácie teórie, metodiky a výsledkov behom vypracovania mojej diplomovej práce a Ing. Petre Matouškovej, Ph.D. za odborné vedenie a venovaný čas.

Zároveň by som sa rada poďakovala RNDr. Radke Podlipnej, Ph.D. za umožnenie práce v Laboratóriu rastlinných biotechnológií na Ústave experimentálnej botaniky Akadémie vied ČR v Prahe.

Za finančnú podporu ďakujem grantu GAČR 18-08452S.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Patrícia Graňáková

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

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Modulácia expresie a aktivity vybraných detoxikačných enzýmov rastlín anthelmintikami

Anthelmintické liečiva kontaminujúce životné prostredie predstavujú rizikový faktor pre necieľové organizmy zahrňujúce rastliny, ktoré s týmito liečivami prichádzajú do kontaktu na poliach prostredníctvom hnojenia hnojom od liečených zvierat alebo na pastvinách prostredníctvom exkrementov liečených zvierat. Po prijatí rastlinou môžu tieto látky zvyšovať produkciu reaktívnych druhov kyslíka, s čím súvisí riziko oxidačného stresu a poškodenia rastliny a taktiež môžu ovplyvniť antioxidantné enzýmy.

Cieľom tejto práce bolo sledovať vplyv dvoch široko využívaných anthelmintík ivermektínu a fenbendazolu na aktivitu a expresiu vybraných antioxidantných enzýmov u Sóje fazuľovej (*Glycine max*). Sója bola vypestovaná v skleníku a zalievaná 10 μM roztokom vybraného liečiva. Zmena aktivity a génovej expresie antioxidantných enzýmov bola sledovaná vo vzorkách z koreňov, listov, strukov a semienok.

Výsledky ukazujú, že obe anthelmintiká spôsobili signifikantný pokles aktivity superoxidodismutázy, askorbátperoxidázy, peroxidázy, glutatiónperoxidázy a glutatión-S-transferázy v koreňoch rastlín. V struku bola znížená aktivita glutatiónreduktázy a askorbátperoxidázy. Obe liečiva tiež spôsobili pokles aktivity askorbátperoxidázy v semienkach. Zvýšená aktivita superoxidodismutázy, peroxidázy a glutatión-S-transferázy bola nameraná v listoch rastlín kultivovaných s fenbendazolom. Štatisticky významné zmeny génovej expresie boli zaznamenané u rastlín kultivovaných s fenbendazolom a to nárast expresie askorbátperoxidázy v listoch, zvýšená expresia katalázy v strukoch a znížená expresia superoxidodismutázy v koreni. U rastlín pod vplyvom ivermektínu bola zaznamenaná znížená expresia katalázy v liste.

Výsledky ukázali, že obidve anthelmintiká použité v tejto práci môžu ovplyvniť aktivitu a expresiu antioxidantných enzýmov, čo môže viesť k oxidačnému poškodeniu rastliny.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Patrícia Graňáková

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

Consultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Modulation of expression and activity of selected plant detoxifying enzymes by anthelmintic

Anthelmintics represent risk to environment as they may impact non-target organisms including plants, which come into contact with these pharmaceuticals in fields by fertilization with dung from treated animals or in pastures by excrements of treated animals. After uptake, these substances can increase the production of reactive oxygen species in plants, with the risk of oxidative stress and plant damage, and also affect the antioxidant enzymes.

The aim of this work was to investigate the effect of two widely used anthelmintics ivermectin and fenbendazole on the activity and expression of selected antioxidant enzymes in soybean (*Glycine max*). Soybean was cultivated in a greenhouse and watered with a 10 μ M solution of the selected drug. The changes of activity and gene expression of antioxidant enzymes were measured in root, leaf, pod and seed samples.

Results showed that both anthelmintics caused significant decrease of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in roots. Decreased activity of glutathione reductase and ascorbate peroxidase were also detected in pods. Both anthelmintics caused decrease of ascorbate peroxidase activity in seeds as well. In addition, activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione S-transferase was increased in leaves of plants cultivated with fenbendazol. Significant changes of gene expression of antioxidant enzymes were observed as well. Increased expression of ascorbate peroxidase in leaves, increased expression of catalase in pods and decreased expression of superoxide dismutase in roots was detected in plants treated with fenbendazol. Decreased expression of catalase was observed in the leaves of plants treated with ivermectin.

The results showed, that both anthelmintics used in this work have an effect on activity and expression of antioxidant enzymes, which can lead to oxidative damage of plant.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1. ANTHELMINTIKÁ.....	10
2.1.1. MAKROCYKlickÉ LAKTÓNY	11
2.1.2. BENZIMIDAZOLY.....	12
2.2. OXIDAČNÉ POŠKODENIE BUNKY	14
2.2.1. OXIDAČNÝ STRES	14
2.2.2. REAKTÍVNE DRUHY KYSLÍKA.....	14
2.2.3. POŠKODENIE V BUNKE SPÔSOBENÉ ROS.....	16
2.3. ANTIOXIDAČNÝ MECHANIZMUS RASTLÍN.....	18
2.3.1. ŠTUDOVANÉ ANTIOXIDAČNÉ ENZÝMY RASTLÍN.....	18
2.4. KUMULÁCIA LIEČIV V ŽIVOTNOM PROSTREDÍ A EKOTOXICITA	24
2.4.1. MOŽNOSTI VSTUPU LIEČIV DO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA.....	26
2.4.2. DÔSLEDKY KONTAMINÁCIE ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA	28
2.4.3. MOŽNOSTI ZNIŽOVANIA KONTAMINÁCIE.....	30
2.5. SÓJA FAZULEOVÁ - <i>GLYCINE MAX</i>	31
3. CIELE PRÁCE	34
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	35
4.1. CHEMIKÁLIE	35
4.2. PRÍSTROJE	35
4.3. PROGRAMY	36
4.4. ZÁSOBNÉ ROZTOKY	36
4.5. PRÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	37
4.5.1. KULTIVÁCIA RASTLÍN V SKLENÍKU.....	37
4.5.2. KULTIVÁCIA RASTLÍN V STERILNÝCH PODMIENKACH.....	39

4.6.	PRÍPRAVA SUBCELULÁRNÝCH FRAKCIÍ.....	40
4.7.	STANOVENIE KONCENTRÁCIE BIELKOVÍN PODĽA BRADFORDOVEJ.....	41
4.8.	STANOVENIE AKTIVITY ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV	42
4.8.1.	STANOVENIE AKTIVITY KATALÁZY.....	42
4.8.2.	STANOVENIE AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY.....	43
4.8.3.	STANOVENIE AKTIVITY ASKORBÁTPEROXIDÁZY	44
4.8.4.	STANOVENIE AKTIVITY PEROXIDÁZY	44
4.8.5.	STANOVENIE AKTIVITY GLUTATIÓNPEROXIDÁZY	45
4.8.6.	STANOVENIE AKTIVITY GLUTATIÓNREDUKTÁZY	46
4.8.7.	STANOVENIE AKTIVITY GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZY	46
4.9.	STANOVENIE EXPRESIE.....	47
4.9.1.	IZOLÁCIA RNA A MERANIE KONCENTRÁCIE RNA.....	47
4.9.2.	REVERZNÁ TRANSKRIPCIA	48
4.9.3.	KVANTITATÍVNA POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA V REÁLNO M ČASE (qRT-PCR).....	49
5.	VÝSLEDKY	51
5.1.	KONCENTRÁCIA BIELKOVÍN.....	51
5.2.	AKTIVITA ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV	53
5.2.1.	AKTIVITA KATALÁZY	53
5.2.2.	AKTIVITA SUPEROXIDDISMUTÁZY	54
5.2.3.	AKTIVITA ASKORBÁTPEROXIDÁZY	55
5.2.4.	AKTIVITA PEROXIDÁZY	56
5.2.5.	AKTIVITA GLUTATIÓNPEROXIDÁZY	57
5.2.6.	AKTIVITA GLUTATIÓNREDUKTÁZY	58
5.2.7.	AKTIVITA GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZY.....	59
5.3.	EXPRESIA ENZÝMOV	60

5.3.1. HODNOTENIE KONCENTRÁCIE, ČISTOTY RNA A ÚČINNOSŤI PRIMEROV.....	60
5.3.2. ANALÝZA EXPRESIE VYBRANÝCH GÉNOV	61
6. DISKUSIA.....	64
7. ZÁVER.....	68
8. ZOZNAM SKRATIEK	69
9. POUŽITÁ LITERATÚRA	71

1. ÚVOD

Anthelmintiká sú liečiva, ktoré sa vo veterinárnej medicíne využívajú vo veľkom množstve k liečbe a k prevencii ochorení spôsobených parazitickými červami. Jednou z možných ciest vstupu týchto liečiv do životného prostredia a jeho kontaminácii je prostredníctvom moču a trusu zvierat liečených anthelmintikami, pretože sú to liečiva, ktoré sú často neúplne metabolizované v organizme zvierat a ich fyzikálne vlastnosti predisponujú ich dlhodobé zotrúvanie v životnom prostredí. Týmto spôsobom predstavujú potenciálne nebezpečenstvo pre necieľové organizmy (Holden-Dye, 2007; Klatte et al., 2017). Jedným z týchto necieľových organizmov ovplyvňovaných rezíduami liečiv sú aj rastliny, ktoré sú schopné prijímať látky z prostredia (Boxall et al., 2006).

Ovplyvnenie aktivity antioxidantných enzýmov rastliny po expozícii anthelmintík môže naznačovať možnosť určitého rizika oxidačného poškodenia v rastline.

Táto práca sa zaoberala vplyvom ivermektínu (IVM) a fenbendazolu (FBZ), liečivami zo skupiny anthelmintík široko používaných v liečbe infekcií spôsobených gastrointestinálnymi červami, pľúcnych a pečenej helmintózy u hydiny, hovädzieho dobytku, oviec a koní, na aktivitu a expresiu vybraných antioxidantných enzýmov sóje fazuľovej (*Glycine max*), bežnej plodiny pestovanej na poliach hnojených maštalným hnojom liečených zvierat.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. ANTHELMINTIKÁ

Anthelmintiká sú liečiva väčšinou syntetického pôvodu, využívané k terapii helmintóz. Helmintózy sú infekčné ochorenia spôsobené červami alebo ich infekčnými štádiami. Tieto červy sú charakteristické plochým alebo oblým pretiahnutým telom a rozdeľujú sa na 2 kmene: kmeň hlístovcov (*Nematoda*) a kmeň ploskavcov (*Plathelminthes*), ktorý sa ďalej delí na dve triedy: pásomnice (*Cestoda*) a motolice (*Trematoda*) (Ducháček & Lamka, 2008).

Hlísty bývajú v tele infikovaného zvierat'a lokalizované v tráviacom trakte alebo pľúcach, pásomnice v dospelom štádiu sa nachádzajú výhradne v čreve. Motolice v definitívnom hostiteľovi napadajú gastrointestinálny trakt, predžalúdok, pečeň alebo pohlavné orgány, výnimkou sú schistozómy nachádzajúce sa výhradne v krvi (Smyth & Halton, 2018)

Vzťah červa a hostiteľa je parazitický, helmintózy sa negatívne prejavujú na zvieratách priamymi aj nepriamymi stratami v ich úžitkovosti – chovateľskej, produkčnej aj reprodukčnej (Ducháček & Lamka, 2008). Dôležitosť eliminácie infekcie týmito červami vzhľadom na možnosť napadnutia a následne zníženia produkcie a počtu poľnohospodárskeho chovu a tiež zo sociálne-ekonomického hľadiska prispieva ku zvyšujúcej sa spotrebe anthelmintík, ktoré sú vo veľkých množstvách používané farmakoterapeuticky aj farmakoprophylakticky (Holden-Dye, 2007).

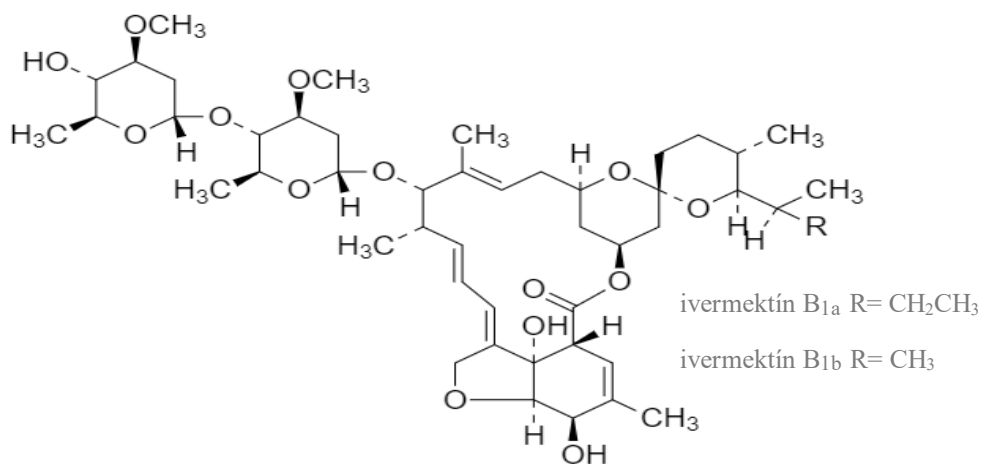
Podľa účinnosti liečiv proti parazitom z jednotlivých tried červov rozlišujeme antinematoda, antitrematoda a anticestoda. Mnohé anthelmintiká však môžu mať účinok súčasne proti viacerým triedam červov. Zástupcovia anthelmintík môžu pôsobiť proti dospelým štádiám alebo vývojovým štádiám helmintov, niektoré môžu pôsobiť aj ovocidne na vajíčka helmintov (Ducháček & Lamka, 2014).

2.1.1. MAKROCYKLICKÉ LAKTÓNY

Makrocyclické laktóny sú látky biosyntetického pôvodu s antinematódnou a antiectoparazitárnou účinnosťou. Rozdeľujú sa na avermektíny a milbemycíny. Zástupcovia makrocyclických laktónov zahŕňajú IVM, moxidektín, milbemycín, doramektín, selamektín, abamektín a eprinomektín. Najčastejšie používanými zlúčeninami tejto skupiny sú abamektín a IVM. Chemická štruktúra avermektínov úzko súvisí so 16-člennými makrocyclickými laktónmi, avšak avermektíny nemajú ani antibakteriálny, ani antimykotický účinok (Bai & Ogbourne, 2016).

Mechanizmus účinku je založený na ovplyvnení neurotransmisie na nervových vláknach parazita. Viazu sa na glutamátové chloridové kanály, ktoré sú prítomné len u nematód a hmyzu, čím spôsobujú zvýšenú permeabilitu a hyperpolarizáciu nervovej bunky (Crump & Ōmura, 2011; Fox, 2006). V prítomnosti týchto látok zostáva chloridový kanál otvorený, čo vedie k blokovaniu signálu medzi neurónom a svalom. Exponované parazity sú následne paralyzované, čo vedie k nekoordinovanému pohybu, hladovaniu a nakoniec smrti (Bai & Ogbourne, 2016).

IVM je historicky prvým liečivom zo skupiny avermektínov a stále jedno z najvýznamnejších liečiv z makrocyclických laktónov aj veterinárnych liečiv všeobecne. IVM je fermentačný produkt mikroorganizmu *Streptomyces avermitilis* (Holden-Dye & Walker, 2014). Jeho chemická štruktúra je uvedená na Obr. 1. Je aktívny voči viacerým nematódam v rôznych životných cykloch. Používa sa pri liečbe viacerých endoparazitických aj ectoparazitických infekcií, vrátane napríklad hemonchózy, toxokarózy, onchocerkózy, svrabu, pedikulózy a iných (Fox, 2006).



OBRÁZOK 1 ŠTRUKTÚRA IVERMEKTÍNU NAKRESLENÁ POMOCOU CHEMDRAW

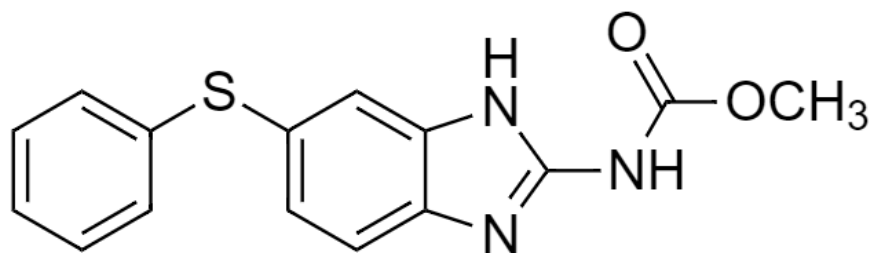
Veľké percento IVM (až 98 %) je vylučované v nemetabolizovanej forme prostredníctvom výkalov liečených zvierat, bez ohľadu na spôsob podania (Beynon, 2012). Predpoklady pre jeho akumuláciu v prostredí spočívajú v jeho hydrofóbnej povahe a vysokej afinite k organickej hmote. Je vysoko toxický pre necieľové druhy ako sú vodné bezstavovce a pôdne bezstavovce (Prasse et al., 2009). Široké spektrum účinnosti IVM proti endoparazitom aj ektoparazitom zvyšuje jeho potenciál vplyvu na necieľové organizmy (Beynon, 2012). Medzi necieľové druhy patria aj rastliny, preto je IVM jeden zo sledovaných liečiv v rastlinách.

2.1.2. BENZIMIDAZOLY

K benzimidazolom využívaným vo veterinárnej praxi patrí: FBZ, albendazol, flubendazol (FLU), mebendazol, tiabendazol, triklabendazol a oxibendazol. Vo forme preliečiva sa používa febantel, ktorý sa po aplikácii *in vivo* metabolizuje na vlastnú účinnú látku FBZ (Ducháček & Lamka, 2008). Hlavný spôsob exkrécie (močom alebo trusom) závisí od špecifickej zlúčeniny (Floate et al., 2005)

Mechanizmus účinku je založený na inhibícii syntézy β -tubulínových subjednotiek, ktoré sú potrebné pre tvorbu mikrotubulov v bunkách parazitov. Inhibícia syntézy tubulínu spôsobí inhibíciu energetického metabolizmu parazitujúceho červa a narušuje tak transport a metabolizmus glukózy. Dôsledkom tohto rozvratu je energetické vyčerpanie, strata pohyblivosti červa a jeho postupné odumretie. Afinita liečiv k parazitárnemu β -tubulínu je mnohonásobne vyššia ako k β -tubulínu hostiteľa, čo umožňuje bezpečne dávkovanie bez vedľajších prejavov na ošetrovaných zvieratách. Pri niektorých zástupcoch tejto skupiny je kontraindikované podanie laktujúcim prežúvavcom s produkciou určenou pre ľudskú konzumáciu a podanie koňom chovaných pre konzumáciu mäsa (Ducháček & Lamka, 2014; Lacey, 1990).

FBZ je liečivo, široko používané vo veterinárnej medicíne na liečbu systémových aj črevných infekcií spôsobených červami. Používa sa pri terapii infekcií spôsobených škrkavkami, pľúcnyimi červami a pásomnicami (Floate et al., 2005). Jeho chemická štruktúra je uvedená na Obrázku 2.



OBRÁZOK 2 ŠTRUKTÚRA FENBENDAZOLU NAKRESLENÁ POMOCOU PROGRAMU CHEMDRAW

V nedávnej dobe sa používanie týchto liečiv zvýšilo, čo viedlo ku vyššej kontaminácii životného prostredia a možným negatívnym efektom na organizmy (Wagil et al., 2015). FBZ je podobne ako IVM vylučovaný najmä trusom, z menšej časti močom a mliekom (McKELLAR & SCOTT, 1990).

FBZ je vzhľadom na jeho spotrebu a potencionálny ekologický dopad ďalším liečivom, ktorého vplyv na antioxidantné enzýmy rastliny som sledovala.

2.2. OXIDAČNÉ POŠKODENIE BUNKY

2.2.1. OXIDAČNÝ STRES

Dôvody spôsobujúce oxidačný stres zahŕňajú najmä:

- I. nerovnováhu medzi generáciou reaktívnych druhov kyslíka (ROS) a detoxikáciou v dôsledku narušenia "normálnej" fyziológie buniek
- II. biosyntézu ROS *de novo* ako súčasť stresovej signalizácie a imunitnej odpovede potrebnej na obranu a adaptáciu (Demidchik, 2015)

Vonkajšie podmienky, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú rastliny, môžu byť biotické (spôsobené inými organizmami) alebo abiotické, ktoré vyplývajú z prebytku alebo deficitu vo fyzickom alebo chemickom prostredí (Apel & Hirt, 2004). Príkladom abiotických stresorov je sucho, salinita, podmáčanie, extrémne teploty, radiácia, nedostatok alebo nadbytok minerálov. Biotické stresory sú stresory, ktoré sa vyskytujú ako dôsledok poškodenia rastlín inými živými organizmami, ako sú baktérie, vírusy, huby, parazity, prospešný a škodlivý hmyz, burina (Saed-Moucheshi et al., 2014). Napriek tomu, že reakcie rastlín na rôzne nepriaznivé environmentálne faktory môžu vykazovať určité spoločné vlastnosti, zvýšenie koncentrácií ROS vyvolané buď biotickým alebo abiotickým stresom je všeobecne priradené rôznym mechanizmom (Apel & Hirt, 2004).

Rastliny odpovedajú na rôzne biotické aj nebiotické stresové faktory produkciou veľkého množstva ROS. Tieto podmienky vytvárajú oxidačný stres, ktorý ovplyvňuje a znižuje funkciu rastlinných buniek, inhibuje rast a rozvíjanie rastliny, v najhoršom prípade môže spôsobiť úhyn rastliny. Rastlina si však rozvíja antioxidantný ochranný mechanizmus, ktorým ROS kontroluje a znižuje na bezpečnú úroveň. Rastliny si rozvíjajú rôzne spôsoby, ktorými sa vyhýbajú, tolerujú alebo adaptujú veľkému spektru nepriaznivých podmienok napr. environmentálneho pôvodu (Apel & Hirt, 2004; Atkinson & Urwin, 2012; Darmanti et al., 2016; Sharma et al., 2012a).

2.2.2. REAKTÍVNE DRUHY KYSLÍKA

ROS sú skupina voľných radikálov, reaktívnych molekúl a iónov, ktoré sú odvodené od O₂. ROS zahŕňajú voľné radikály, ako je superoxidový anión (O₂^{•-}),

hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), perhydroxylový radikál ($\text{O}_2\text{H}\bullet$), ale aj neradikálové molekuly, ako je peroxid vodíka (H_2O_2), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) a tak ďalej (Halliwell, 1999; Sharma et al., 2012a).

Organely s vysoko oxidujúcou metabolickou aktivitou alebo s intenzívnym prietokom elektrónov, ako sú chloroplasty, mitochondrie, peroxizómy a endoplazmatické retikulum, sú hlavnými zdrojmi produkcie ROS v rastlinách. ROS sú produkované aj peroxidázami (prítomné v bunkovej stene), oxalát oxidázami a aminoxidázami nachádzajúcimi sa v apoplaste a NADPH-oxidázou, ktorá je viazaná v plazmatickej membráne a produkuje superoxid, často v reakcii na stresové signály (Charan Tripathy & Oelmüller, 2012; Piterková et al., 2005).

Sú vedľajšími produktami aeróbného rastlinného metabolizmu. Pri normálnych podmienkach sú tieto radikály produkované len v malých množstvách a slúžia ako signálne molekuly/sekundárni poslovia intracelulárneho signálu, ktoré sprostredkujú rôzne rastlinné reakcie na biotické a abiotické stavy. Syntéza veľkého množstva je spustená rôznymi stresujúcimi podmienkami. Tieto podmienky vo výsledku spôsobujú prechod rastliny do oxidačného stresu. Tento stav môže predstavovať hrozbu pre bunky tým, že spôsobí peroxidáciu lipidov, oxidáciu proteínov, poškodenie na nukleových kyselinách, inhibíciu enzýmov, aktiváciu dráhy programovanej bunkovej smrti, nakoniec vedúcu k smrti buniek (Apel & Hirt, 2004; Sharma et al., 2012a; Soumen, 2005). To, či ROS slúžia ako signalizačné molekuly alebo môžu spôsobiť oxidačné poškodenie tkanív, závisí od jemnej rovnováhy medzi produkciou ROS a ich vychytávaním. Účinné zachytávanie ROS produkovaných počas rôznych environmentálnych stresov, vyžaduje účinok viacerých neenzymatických, ako aj enzýmových antioxidantov prítomných v tkanivách (Sharma et al., 2012a). V podmienkach fyziologického ustáleného stavu sú tieto molekuly zachytávané rôznymi antioxidantnými obrannými zložkami, ktoré sú často obmedzené na konkrétne oddelenia (Apel & Hirt, 2004).

Zatiaľ čo pri normálnych podmienkach rastu je produkcia ROS v bunkách nízka ($240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ a ustálená hladina $0,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ v chloroplastoch), veľa stresorov, ktoré narušujú bunecnú homeostázu, zvyšujú tvorbu ROS ($240-720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ a ustálená hladina 5 až $15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) (Mittler, 2002).

Bolo tiež zistené, že prítomnosť superoxidu alebo peroxidu vodíka v apoplaste má pozitívnu úlohu, to znamená, že je toxický pre patogény. Keď rastlina rozpozná útoiaci patogén, jednou z prvých vyvolaných reakcií je rýchlo produkovať superoxid alebo peroxid vodíka. Tým sa zabraňuje šíreniu patogénu na iné časti rastliny, ktoré

v podstate tvoria sieť okolo patogénu, aby obmedzili jeho pohyb a reprodukciu a obmedzuje šírenie napádajúcich organizmov bunkovou smrťou okolo infikovaných buniek (Apel & Hirt, 2004; Atkinson & Urwin, 2012; Saed-Moucheshi et al., 2014).

2.2.3. POŠKODENIE V BUNKE SPÔSOBENÉ ROS

ROS môžu nešpecificky interagovať s rôznymi bunkovými zložkami, vyvolávať peroxidačné reakcie a spôsobovať značné poškodenie životne dôležitých molekúl, ako sú proteíny, lipidy a nukleové kyseliny (Halliwell, 1999; Mittler, 2002). Tieto reakcie môžu meniť vnútorné vlastnosti membrány, ako je fluidita, transport iónov, strata aktivity enzýmov, zosieťovanie proteínov, inhibícia syntézy proteínov, poškodenie deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) atď., čo nakoniec vedie k bunkovej smrti. V tejto situácii sa vyskytujú početné škodlivé účinky ROS na rast a metabolizmus rastliny. Preto ich hladiny nesmú prekročiť optimálnu hodnotu v bunkách (Saed-Moucheshi et al., 2014).

Poškodenie lipidov spôsobené ROS prebieha na fosfolipidoch, ktoré sú súčasťou bunečnej membrány a organel. Sú primárne citlivé k oxidácii a ľahko podliehajú peroxidácii. Tento jav priamo spôsobuje nestabilitu bunečnej membrány a tiež zvyšuje jej permeabilitu. Zároveň lipidová peroxidácia zhoršuje oxidačný stres prostredníctvom produkcie ďalších radikálov odvodených od lipidov, ktoré môžu poškodzovať proteíny a DNA. Polynenasýtené mastné kyseliny prítomné v membránových fosfolipidoch sú obzvlášť citlivé na napadnutie ROS. K oxidácii sú náchylné najmä kyselina arachidonová a kyselina dokozahehexaénová, ktoré vedú k malondialdehydu a 4-hydroxynonenalu, známym markerom lipidového oxidačného rozpadu. Tieto reaktívne aldehydy sa následne môžu pripojiť k proteínom a tak môžu zhoršiť ich funkciu. Úroveň peroxidácie lipidov sa často používa ako indikátor poškodenia bunkových membrán sprostredkovaných ROS pri stresových podmienkach. Zvýšená peroxidácia (degradácia) lipidov bola zaznamenaná v rastlinách, ktoré rastú pod vplyvom environmentálnych stresov. Zvýšenie lipidovej peroxidácie pri týchto stresoch je paralelné so zvýšenou produkciou ROS.

ROS môže spôsobiť oxidačné poškodenie jadrovej, mitochondriálnej a chloroplastovej DNA. DNA je genetický materiál bunky a akékoľvek poškodenie DNA môže viesť k zmenám v kódovaných proteínoch, čo môže viesť k poruche alebo úplnej inaktivácii kódovaných proteínov. Oxidačný útok na DNA má za následok oxidáciu deoxyribózy, zlomenie reťazca, odstránenie nukleotidov, rôzne modifikácie

v organických bázach nukleotidov a zosieťovanie DNA-proteínov (Pisoschi & Pop, 2015; Sharma et al., 2012b). Zvýšená degradácia DNA bola pozorovaná u rastlín vystavených rôznym environmentálnym stresom, ako je salinita a toxicita kovov (Sharma et al., 2012b).

Okrem lipidov, ROS spôsobujú oxidáciu proteínov modifikáciou ich kovalentnej väzby. V dôsledku nadmernej produkcie ROS dochádza k lokálnej modifikácii aminokyselín, fragmentácii peptidového reťazca, agregácii zosieťovaných reakčných produktov, zmeneniu elektrického náboju a zvýšeniu citlivosti proteínov na proteolýzu. Tkanivá poškodené oxidačným stresom vo všeobecnosti obsahujú zvýšené koncentrácie karbonylovaných proteínov, ktoré sú široko používaným markerom oxidácie proteínov. Zvýšená modifikácia proteínov bola zaznamenaná u rastlín s rôznymi namáhaniaми. Aminokyseliny v peptide sa líšia svojou náchylnosťou na napadnutie ROS, najnáchylnejšie k poškodeniu sú proteíny obsahujúce síru a thiolovú skupinu (Pisoschi & Pop, 2015).

2.3. ANTIOXIDAČNÝ MECHANIZMUS RASTLÍN

Rastliny majú schopnosť vychytávať/detoxikovať ROS tým, že produkujú rôzne typy antioxidantov. Antioxidanty sa delia na dve skupiny a to na enzymatické a neenzymatické antioxidanty. Oba tieto systémy majú dôležitú rolu v ochrane rastliny pred poškodením spôsobeným oxidačným stresom. Medzi enzýmové antioxidanty patrí superoxid-dismutáza, kataláza, peroxidáza a niektoré ďalšie enzýmy, ktoré sú súčasťou askorbát-glutathiónového cyklu, ako je askorbátperoxidáza, monodehydroaskorbátreduktáza, dehydroaskorbátreduktáza a glutatiónreduktáza.

Najvýznamnejšie neenzymatické antioxidanty sú glutatión (GSH), askorbát (AsA) -ktoré sú súčasťou askorbát-glutathiónového (AsA-GSH) cyklu, karotenoidy, tokoferoly, flavóny a antokyány (Saed-Moucheshi et al., 2014).

Aktivita mnohých enzýmov antioxidačného obranného systému sa v rastlinách zvyšuje na boj proti oxidačnému stresu vyvolanému rôznymi environmentálnymi stresormi. Údržba vysokej antioxidačnej kapacity na zachytávanie toxických ROS bola spojená so zvýšenou toleranciou rastlín voči týmto environmentálnym stresorom (Sharma et al., 2012a).

2.3.1. ŠTUDOVANÉ ANTIOXIDAČNÉ ENZÝMY RASTLÍN

2.3.1.1. KATALÁZA

Kataláza (CAT) je jedným z najdôležitejších antioxidačných enzýmov, ktorého úlohou je metabolizovať stresovou reakciou vyprodukované ROS a potlačovať ich toxické hladiny v bunke (Apel & Hirt, 2004). CAT katalyzuje redoxnú reakciu, pri ktorej rozkladom peroxidu vodíka vzniká voda a kyslík (H_2O_2 na H_2O a O_2) (Saed-Moucheshi et al., 2014). Má významnú úlohu nie len v rastlinnej obrane a metabolizme, ale aj v signálnej percepcii (Anjum et al., 2016).

Je to tetramerický enzým a zároveň patrí medzi hemové enzýmy. Prítomnosť hemovej prostetickej skupiny v molekule CAT je potvrdená možnosťou inhibície tohto enzýmu pomocou hemoproteinových inhibítorov ako je kyanid, azid a hydroxylamín.

CAT je prítomná v peroxizómoch, glyoxyzómoch a príbuzných organelách, kde sa nachádzajú enzýmy generujúce H_2O_2 (Dat et al., 2000). Taktiež sú dôkazy existencie CAT v mitochondriách (Anjum et al., 2016).

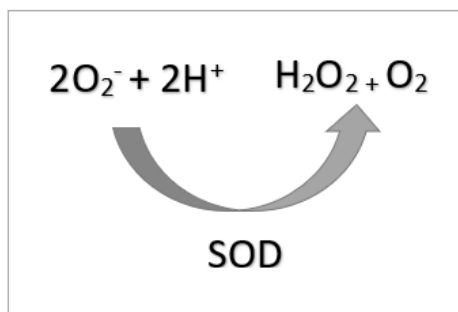
Existujú tri hlavné izoformy: CAT1, CAT2 a CAT3. CAT1 sú vysoko exprimované v listoch, sú závislé od svetla a podieľajú sa na odstraňovaní H_2O_2 počas fotorespirácie.

CAT2 sa nachádzajú hlavne v cievnych zväzkoch. CAT3 sa podieľajú hlavne na odstraňovaní H_2O_2 z glyoxyzómov a sú vysoko zastúpené v semenách a v mladých sadenicích (Dat et al., 2000).

CAT nevyžaduje pre svoju funkciu prítomnosť redukčných činidiel na rozdiel od napríklad askorbátperoxidázy (APX) a preto môže byť necitlivá na redoxný stav buniek a funkcia tohto enzýmu nemusí byť počas stresu ovplyvnená, na rozdiel od iných mechanizmov. Je aktívna hlavne pri pomerne vysokých koncentráciách peroxidu vodíka počas stresu (Mittler, 2002).

2.3.1.2. SUPEROXIDDISMUTÁZA

Superoxiddismutáza (SOD) je jeden z antioxidantných enzýmov, chrániacich rastlinné bunky pred potenciálnym poškodením prostredníctvom ROS. Chráni bunky katalýzou premeny cytotoxického radikálu $O_2^{\cdot -}$ na O_2 a H_2O_2 (Obr. 3). Odstránením tohoto radikálu, SOD znižuje riziko vzniku OH^{\cdot} . Princíp funkcie SOD je uvedený v nasledujúcej rovnici : $2 O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Výsledkom reakcie je produkcia H_2O_2 , ktorý tiež patrí medzi ROS a môže byť účinne detoxikovaný antioxidantnou ochrannou, napríklad enzýmom CAT.



OBRÁZOK 3 ZNÁZORNENIE FUNKCIE SOD

Pretože SOD sú multimérne metaloproteíny, majú rôzne izoformy, založené na kovových kofaktoroch prítomných na ich aktívnych miestach. Najbežnejšie izoformy SOD, ktoré sú známe, sú SOD obsahujúca meď a zinok (Cu/Zn-SOD), mangán obsahujúca SOD (Mn-SOD), SOD s obsahom železa (Fe-SOD) a nikel obsahujúca SOD (Ni-SOD). Cu/Zn-SOD je lokalizovaná v cytosole, chloroplastoch a peroxizómoch, kým Fe-SOD je lokalizovaná z najväčšej časti v chloroplastoch a v určitom rozsahu aj v peroxizómoch a apoplaste. Mn-SOD sa vyskytuje hlavne v mitochondriách. Všetky

izoformy SOD sú kódované nukleárne a v prípade potreby sú transportované do príslušných organel.

V Cu/Zn-SOD sú disulfidickou nekovalentnou väzbou spojené bivalentné atómy Cu a Zn. Z týchto dvoch atómov je atóm medi považovaný za dôležitejší ako atóm zinku, pretože substitúcia medi za iný kov (alebo jej odstránenie zo štruktúry) spôsobí inaktiváciu enzýmu. Rola Zn je skôr štrukturálna ako funkčná, pretože podľa viacerých zdrojov jeho substitúciou za napríklad Co^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} alebo dokonca úplnou elimináciou nedôjde k signifikantnému ovplyvneniu enzymatickej aktivity.

Indukcia SOD v reakcii na rôzne stresové prostredie odzrkadľuje jej dôležitú úlohu v rastlinných bunkách v reakcii na rôzne stresové prostredie a odráža jej dôležitú úlohu v obrannom mechanizme rastlín. Stresové podmienky všeobecne zvyšujú aktivitu SOD na zachytávanie superoxidových radikálov (Fridovich, 1975; Fridovich, 1986; Gill et al., 2015).

2.3.1.3. ASKORBÁTPEROXIDÁZA

Kľúčovým enzýmom vychytávajúcim peroxid vodíka je APX. Vyskytuje sa v chloroplastoch, cytosole, mitochondriách a peroxizómoch. APX účinne odstraňuje aj veľmi nízke koncentrácie peroxidu vodíka.

APX je súčasťou AsA-GSH cyklu. Pri redukcii H_2O_2 na H_2O využíva ako špecifický elektrónový donor AsA (Saed-Moucheshi et al., 2014). Pri premene H_2O_2 na H_2O je AsA oxidovaná na monodehydroaskorbovú kyselinu, ktorá môže byť regenerovaná monodehydroaskorbátreduktázou za súčasnej spotreby NADPH. Regenerácia AsA je stimulovaná oxidáciou GSH na jeho oxidovanú formu (GSSG). Posledným krokom je regenerácia GSSG na GSH pomocou glutatiónreduktázy (GR) využívajúc redukčné činidlo NADPH (Mittler, 2002).

Keďže izoformy APX vykazujú vyššiu hodnotu afinity pre peroxid vodíka ako CAT, predpokladá sa, že APX sa podieľa najmä na modulácii hladiny H_2O_2 za fyziologických podmienok a CAT redukuje prebytky H_2O_2 vznikajúce pri oxidatívnom strese (Cruz de Carvalho, 2008).

2.3.1.4. PEROXIDÁZA

POX sú hem-obsahujúce enzýmy, lokalizované vo vakuolách a bunečných stenách (Almagro et al., 2009). Hrajú dôležitú úlohu pri produkcii a vychytávaní ROS katalýzou

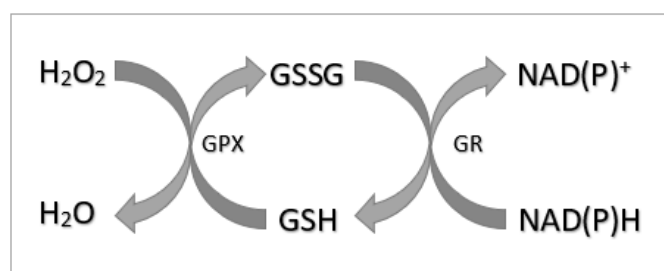
oxidoredukcie medzi H_2O_2 a rôznymi organickými a anorganickými zlúčeninami. Okrem toho môžu rastlinné POX oxidovať rôzne substráty, produkujú radikály (Wang et al., 2015). POX redukuje molekulu H_2O_2 na vodu a súčasne oxiduje substrát : $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{RH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{R}\cdot$ (Shigeto & Tsutsumi, 2016). V prípade, že je substrátom molekula ako napríklad thiol alebo kyselina salicylová, z ktorých môžu vznikať ROS, radikál derivátu reaguje s molekulou O_2 za vzniku superoxidového radikálu (Shigeto & Tsutsumi, 2016). POX sa tiež podieľajú na lignifikácii, predĺžení buniek, obranyschopnosti proti stresu a klíčení semien (De Gara, de Pinto, & Tommasi, 2003)

Aktivita alebo expresia POX je indukovaná baktériami, vírusmi a hubami s cieľom obmedziť šírenie infekcie patogénom bunkami prostredníctvom vytvárania štrukturálnych bariér alebo vytvárania vysoko toxických prostredí masívnym produkovaním ROS (Almagro et al., 2009)

Hoci kľúčovou funkciou rastlinných POX je oxidácia fenolových substrátov na úkor H_2O_2 , POX môže paradoxne a prechodne generovať $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (Almagro et al., 2009). Preto funkcia POX nepozostáva len z oxidácie cieľových molekúl priamo s použitím H_2O_2 , ale je aj kľúčovým faktorom pri tvorbe ROS (Shigeto & Tsutsumi, 2016).

2.3.1.5. GLUTATIÓNPEROXIDÁZA

Medzi ďalšie významné antioxidačné enzýmy patrí glutatiónperoxidáza (GPX), ktorá sa uplatňuje predovšetkým pri zabránení peroxidácií membránových lipidov (Piterková et al., 2005). GPX je selén-dependntný cytosolový enzým katalyzujúci redukciu H_2O_2 , organických hydroperoxidov a peroxidov lipidov na vodu a alkoholy, s použitím GSH ako kofaktoru. Pri tejto redukcii peroxidu vodíka na vodu zároveň dochádza k oxidácii redukovaného GSH na jeho oxidovanú formu GSSG (Obr. 4) (Hayes & McLellan, 1999).



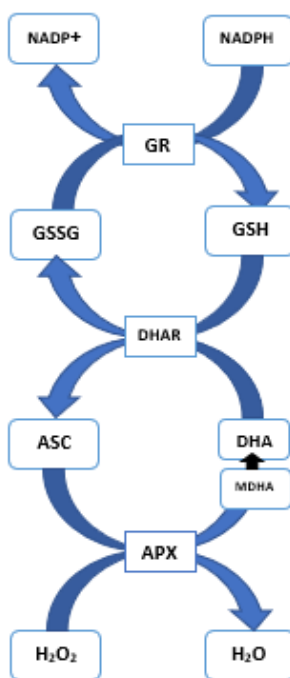
OBRÁZOK 4 ZNÁZORNENIE FUNKCIE GPX AKO ANTIOXIDAČNÉHO ENZÝMU

2.3.1.6. GLUTATIÓNREDUKTÁZA

Spolu s tripeptidom GSH dôležitou súčasťou cyklu AsA-GSH je enzým GR, ktorý má podstatnú úlohu pri ochrane buniek pred ROS a ich dôsledkami (Obr. 5). GR a GSH sú spolu prepojené, keďže GR je NADPH-dependentný enzymatický antioxidant (Singh Gill et al., 2013). GR katalyzuje redukciiu GSSG naspäť na jeho redukovanú formu GSH v AsA-GSH cykle a pri reakcii GPX za súčasnej oxidácie redukovaného nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátu (NADPH+). GR týmto spôsobom pomáha udržiavať správny pomer GSH/GSSG (označovaný aj ako bunková redoxná rovnováha), ktorý má významnú úlohu pri transdukcii signálu stresu (Saed-Moucheshi et al., 2014; Singh Gill et al., 2013).

GR je lokalizovaná hlavne v chloroplastoch (70-80 %), ale malé množstvo sa nachádza aj v mitochondriách a cytosole.

Hlavným zapojením GR do odolnosti voči stresu je recyklácia GSH a udržiavanie pomeru GSH/GSSG v rastlinnej bunke (Singh Gill et al., 2013).



OBRÁZOK 5 SCHÉMATICKÉ ZOBRAZENIE FUNKCIE APX A GR POČAS ASA-GSH CYKLU.

DHAR = DEHYDROASKORBÁTREDUKTÁZA; DHA = DEHYDROASKORBÁT; MDHA = MONODEHYDROASKORBOVÁ KYSELINA

2.3.1.7. GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZA

Glutatión-S-transferáza (GST) je enzým, ktorý môže katalyzovať konjugáciu GSH so zlúčeninami, ktoré obsahujú elektrofilné centrum cez tvorbu tiol-éterovej väzby medzi atómom síry, GSH a substrátom (Carlberg & Mannervik, 1985; Hayes & McLellan, 1999; Mannervik, 2006). Okrem syntézy glutatiónových S-konjugátov, GST katalyzujú redukciu zlúčenín obsahujúcich peroxid, ktoré môžu byť inak toxické pre bunku (Carlberg & Mannervik, 1985).

Klasicky sa predpokladá, že enzýmy GST hrajú hlavnú úlohu vo fáze II metabolizmu liekov, kde prispievajú k prežitiu buniek detoxikáciou cudzích zlúčenín. V tejto úlohe činnosť GST nasleduje po fázi I metabolizmu liekov, ktorá je často katalyzovaná členmi nadrodiny cytochrómu P450.

Okrem detoxikácie cudzích zlúčenín existuje množstvo škodlivých endogénnych zlúčenín, ktoré sa tvoria ako vedľajšie produkty normálneho metabolizmu, ktoré sú substrátmi GST. Mnohé tieto endogénne substráty GST sa tvoria ako dôsledok modifikácie makromolekúl reaktívnymi druhmi kyslíka a transferázy sa preto považujú za slúžiace antioxidantnej funkcii. GST majú schopnosť redukovať tieto zlúčeniny, čím sa stávajú neškodnými. Tiež pôsobia na detoxikáciu následných produktov oxidačného poškodenia, ako sú reaktívne aldehydy 4-hydroxynonenal a akroleín (Carlberg & Mannervik, 1985; Hayes & McLellan, 1999).

Peroxidázová aktivita GST si vyžaduje GSH. Ide o dvojstupňovú reakciu. Prvým krokom je enzymatická redukcia peroxidu na alkohol pri súbežnej výrobe hydroxylovaného glutatiónu. Druhý krok zahŕňa spontánnu reakciu hydroxylovaného glutatiónu s molekulou GSH na vodu a GSSH. Príklady tohto typu substrátu zahŕňajú hydroperoxydy mastných kyselín a fosfolipidov (Anderson et al. , 2001).

Tieto biochemické údaje naznačujú, že GST neposkytuje prvú líniu obrany proti voľným radikálom, čo je zabezpečené SOD, CAT a GPX. GST však predstavuje druhú obrannú líniu proti vysoko toxickému spektru látok produkovaných reakciami sprostredkovanými ROS a kvôli ich širokej substrátovej špecificite sú pre túto úlohu vhodné (Hayes & McLellan, 1999).

2.4. KUMULÁCIA LIEČIV V ŽIVOTNOM PROSTREDÍ A EKOTOXICITA

Napriek tomu, že v humánnej a veterinárnej medicíne sa používa široká škála rôznych druhov liečiv, len málo z nich sa považuje za dôležité pre životné prostredie z dôvodu objemu ich spotreby, toxicity a pretrvávania v životnom prostredí. Jedná sa o beta-blokátory, cytostatické a onkologické lieky, analgetiká a protizápalové látky, steroidné hormóny, neuroaktívne zlúčeniny, antiparazitiká, liečivá znižujúce hladinu lipidov v krvi a antibiotiká (Fent, Weston, & Caminada, 2006; Morley, 2009).

Hoci vedľajšie účinky na zdravie ľudí a zvierat sa zvyčajne skúmajú v dôkladných bezpečnostných a toxikologických štúdiách, potenciálne vplyvy výroby a používania liekov na životné prostredie sú menej dobre pochopené a len nedávno sa stali témou výskumného záujmu (Breton & Boxall, 2003; Daughton, 2007; Fent et al., 2006). Okrem toho produkty rozkladu a kombinácia rôznych biologicky aktívnych zlúčenín môžu mať neočakávané účinky na životné prostredie. Hoci je pravdepodobné, že tieto látky podstatne neškodia ľuďom, nedávno sa začalo skúmať, či a ako ovplyvňujú širokú škálu organizmov v životnom prostredí a čo to znamená pre zdravie životného prostredia (Boxall, 2004).

Environmentálny osud anthelmintických liekov a ich metabolitov závisí od ich fyzikálne-chemických vlastností. Pred vstupom do prostredia sa môžu liečivá metabolizovať v živých organizmoch na metabolity fázy I alebo fázy II. Reakcie fázy I sú zvyčajne oxidácia, redukcia alebo hydrolýza a metabolity sú často reaktívnejšie a toxicejšie ako pôvodné liečivo. Reakcie fázy II často vedú k neaktívnym zlúčeninám. Pri vstupe do životného prostredia sa lieky podrobia biodegradácii, chemickej degradácii a fotochemickej degradácii, ktoré prispievajú k ich eliminácii alebo sú transformované v reakciách s inými zlúčeninami. Degradácia, ktorou prechádzajú zlúčeniny v prostredí vytvára metabolity, ktoré sú často totožné s metabolitmi vyskytujúcimi sa v organizme. Metabolity niektorých zlúčenín ako sú napríklad metabolity chloramfenikolu, sulfadiazínu, estrogénu a sulfametazínu sa môžu premeniť späť na pôvodnú zlúčeninu, akonáhle sa dostanú do životného prostredia (Jjemba, 2002b).

Kombinácia času a frekvencie aplikácie s rôznymi charakteristikami liečiv (aktívna zložka, zloženie, dávka a stupeň v akom sa metabolizujú v hostiteľovi) ovplyvňujú cestu vylučovania a perzistencie v prostredí (Horvat et al., 2012).

Nie je prekvapením, že nedávne monitorovacie štúdie zistili nízke hladiny širokého spektra liečiv, vrátane hormónov, steroidov, antibiotík a antiparazitík v pôde, povrchových vodách a podzemných vodách (Fent et al., 2006). Uvádzané koncentrácie sú zvyčajne nízke - zvyčajne menej ako 1 µg/l v povrchových vodách – niektoré látky boli však pozorované počas celého roka v rôznych hydrologických, klimatických a územných podmienkach. Tieto zistenia vyvolali otázky o tom, ako táto zmes veterinárnych a humánnych liekov v pôde a povrchových vodách ovplyvňuje organizmy v životnom prostredí a ľudské zdravie (Boxall et al., 2006).

Väčšina dostupných informácií o anthelmintikách v životnom prostredí sa týka makrocyclických laktónov. Vo väčšine prípadov sa až 98% makrocyclických laktónov vylučuje v nezmenenej forme stolicou alebo ako aktívne metabolity. Hoci sú vysoko lipofilné a slabo rozpustné vo vode, ale ľahko rozpustné vo väčšine organických rozpúšťadiel, preukázali sa, že majú vplyv na reprodukciu, biologickú funkciu a prežitie ne cieľových suchozemských a vodných organizmov (Horvat et al., 2012). IVM je relatívne perzistentná zlúčenina v hnoji a pôde s údajným polčasom rozpadu v pôde 7-14 dní v lete a 91-217 dní v zime (Boxall et al., 2004). Štúdie preukázali vysokú toxicitu pre ne cieľové organizmy v pôde, v sladkovodných a morských prostrediach (Horvat et al., 2012). V pôde na území USA boli detegované stopové množstvá IVM o koncentrácií 0,1-2 µg /kg v hornej vrstve pôdy, kde bol vykrmovaný hovädzí dobytok 28 dní predtým liečený IVM (Boxall et al., 2004).

Makrocyclické laktóny môžu ovplyvniť larvy bezstavovcov v truse pri pomerne nízkych koncentráciách. Štúdie ekotoxicity na živých organizmoch ukázali, že makrocyclické laktóny ovplyvňujú mortalitu lariev bezstavovcov v hnoji s hodnotou 50% letálnej koncentrácie nižšou ako 0,036 mg/kg (Horvat et al., 2012). Okrem toho sa ukázalo, že makrocyclické laktóny vyvolávajú mnoho subletálnych odpovedí u bezstavovcov v hnoji, ako je zníženie kŕmenia, narušenie vodnej rovnováhy, zníženie rýchlosti rastu a narušenie párenia. Keďže hnoj z hospodárskych zvierat obsahuje rozmanitú faunu a poskytuje plodný biotop pre iné druhy, makrocyclické laktóny môžu nepriamo ovplyvňovať ostatné druhy tým, že znižujú kvalitu a kvantitu ich potravinového zdroja (Boxall, 2004).

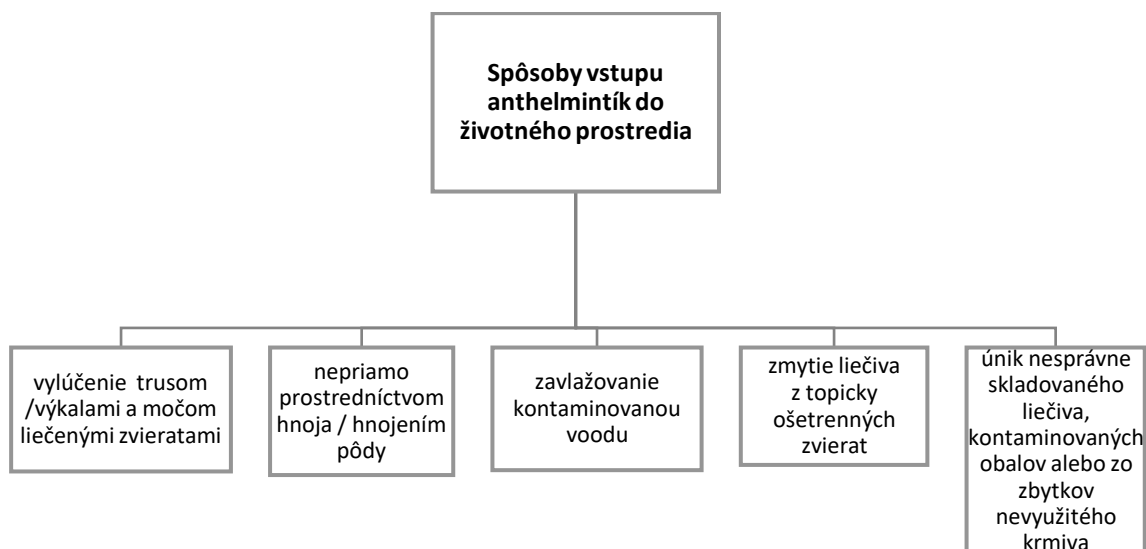
Xenobiotické účinky na rastlinách zahŕňajú nielen biochemické a fyziologické narušenie založené na interakcii s makromolekulárnymi alebo bunkovými cieľmi, ale aj narušenie signalizačných dráh. Xenobiotiká majú schopnosť indukovať zmeny na úrovni expresie génov, regulácie a prenosu signálu. Navyše niektoré špecifické

xenobiotiká interagujú s rastlinnými hormónovými receptormi a signálnymi dráhami rastlinných hormónov. Modifikácie génovej expresie, odhalené vďaka rozvoju analýzy transkriptomiky a proteomiky, sa ukázali ako dôležité mechanizmy reakcie rastlín na xenobiotiká (Bártíková et al., 2016).

2.4.1. MOŽNOSTI VSTUPU LIEČIV DO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA

Humánne a veterinárne liečivá sa uvoľňujú do životného prostredia rôznymi cestami. Najvýznamnejšie zdroje znečistenia životného prostredia sú predovšetkým rezíduá z terapie zvierat (hospodárskych zvierat, spoločenských zvierat a z terapie v akvakultúre), ďalej nevhodné zneškodňovanie použitých kontajnerov a nepoužitých liekov alebo krmív pre zvieratá. Intenzívne ošetrovanie hospodárskych zvierat a akvakultúry sa považuje za významnejší zdroj ako liečenie spoločenských zvierat. Aplikovanie liekov intenzívne chovaným hospodárskym zvieratám predstavuje hlavnú cestu vstupu do suchozemského prostredia, zatiaľ čo akvakultúrna terapia má vysoký potenciál na dosiahnutie vodného prostredia, pretože liečiva sa pridávajú priamo do životného prostredia. Vylučovanie liekov a/alebo ich metabolitov do moču a fekálií dobytky, zmytie z topicky ošetrovaných hospodárskych zvierat a priame vypúšťanie produktov akvakultúry sú pravdepodobne najdôležitejším vstupom do prostredia. Nepoužitú veterinárnu lieky a ich obaly zvyšujú množstvo veterinárnych liečiv kontaminujúcich pôdu a vodu. Časť rezíduí môže byť dôsledkom emisií z výrobných procesov (Boxall et al., 2004; Daughton, 2007). Jedným z ďalších spôsobov kontaminácie je znečistenie z chovných zariadení, ktoré využívajú podávanie veterinárnych liečiv vo forme prášku, kedy môže dôjsť k rozptylu tohto prášku vo vzduchu, ktorý je následne vzduchotechnikou odvádzaný do okolitého prostredia (Klatte et al., 2017).

Zhrnutie možných spôsobov kontaminácie životného prostredia anthelmintikami zobrazuje Obrázok 6.



OBRÁZOK 6 SPÔSOBY VSTUPU ANTHELMINTÍK DO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA

Priamou cestou kontaminácie je likvidácia liekov a používanie veterinárnych liekov u zvierat chovaných na pasienkoch, ktoré vylučujú rezíduá liekov priamo do životného prostredia. Nepriama cesta pozostáva z použitia hnoja a kalu pochádzajúceho z ošetrovaných zvierat na pôdu. V tomto prípade metabolit lieku nevzniká iba u zvierat, ale zlúčeniny sa môžu počas skladovania hnoja ďalej rozkladať. Doba perzistencie veterinárnych liekov v hnoji sa môže líšiť od dní na mesiace a závisí aj od typu hnoja (Bártíková et al., 2016; Daughton, 2007).

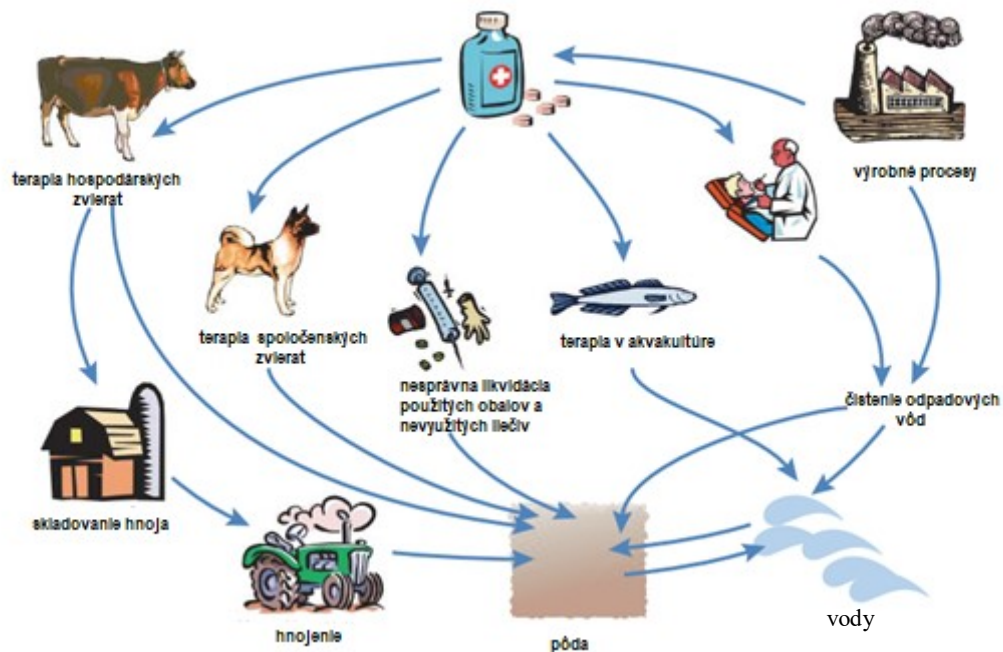
Značné množstvá týchto liečiv a ich metabolitov sú vylučované, spláchnuté cez odtok, odhodené ako odpad alebo zostávajú v krmive zvierat. Keď vstupujú do kanalizácie, niektoré z týchto zlúčenín nie sú dostatočne eliminované metódami, ktoré sa v súčasnosti používajú pri čistení odpadových vôd. Podstatné množstvá biozložiek a hnoja od hospodárskych zvierat skončia na poľnohospodárskej pôde (Obr. 7). V laboratórnych štúdiách bol rast a vývoj rastlín ako napríklad vývoj fazule obyčajnej (*Phaseolus vulgaris L.*), sóje fazuľovej (*Glycine max*), lucerny siatej (*Medicago sativa*), kukurice siatej (*Zea mays*) a niekoľkých ďalších rastlín, ovplyvnený niektorými bežne používanými terapeutikami (Jjemba, 2002a).

Pri podaní orálne alebo parenterálne sa antiparazitiká pred vylúčením z väčšej časti metabolizujú, kým pri podaní pour-on sa vylučujú vo veľkej miere nezmenené. Zmytie topicky aplikovaných zlúčenín z rúna, rozliatie počas aplikácie a nevhodné zlikvidovanie zlúčenín poskytujú ďalšie dôležité vstupné body pre životné prostredie.

Kontaminácia nie je obmedzená na pôdu a hnoj; lieky sa môžu vylúhovať do podzemnej vody a dostať sa do vodných plôch cez povrchové odtoky alebo sa vylúčiť alebo spláchnuť z ošetrovaných zvierat priamo do vodného toku (Beynon, 2012).

Okrem toho sa degradácia výrazne líši v závislosti od chémie, biológie a klimatických podmienok. Napríklad počas rozpadu antiparazitárneho IVM v zimných podmienkach je šesťkrát vyšší ako v lete a rýchlosť rozpadu môže byť ovplyvnená aj typom pôdy (Boxall, 2004).

Takáto expozícia môže alebo nemusí mať vplyv na rast a vývoj daných rastlín, vplyv väčšinou závisí od typu zlúčeniny, dávkovania, kinetiky sorpcie (adsorpcie a desorpcie) a mobility v pôde (Jjemba, 2002a).



OBRÁZOK 7 ZNÁZORNENIE NIEKOTRÝCH MOŽNÝCH PRÍČIN KONTAMINÁCIE A SPÔSOBY ICH PRIENIKU DO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA. ÚPRAVENÉ A PRELOŽENÉ Z BOXALL, 2004

2.4.2. DÔSLEDKY KONTAMINÁCIE ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA

Aj keď nie je dôkaz o tom, či bioakumulácia niektorých terapeutických zlúčenín predstavuje významné zdravotné riziko pre spotrebiteľov napadnutých rastlín, nie je

pochýb o tom, že niektoré zlúčeniny poškodzujú rast rastlín, čo je zrejmé z kontrolovaných laboratórnych pokusov (Jjemba, 2002a).

Dopady na životné prostredie sa ťažšie posudzujú. Od roku 1980 požaduje Úrad pre potraviny a liečivá (FDA, USA) hodnotenie environmentálnych rizík pre humánne a veterinárne lieky o účinkoch na vodné a suchozemské organizmy skôr, ako umožnia vstup výrobku na trh a Európska Únia zaviedla podobné opatrenia v roku 1997. Tieto štúdie o vplyve na životné prostredie skúmajú potenciálne negatívne účinky na ryby, dafnidy, riasy, baktérie, dážďovky, rastliny a na bezstavovce prítomné v hnoji (Boxall, 2004).

Výskumníci sa preto začali detailnejšie zaoberať niektorými účinkami spôsobenými dlhodobou expozíciou nízkymi koncentraciami liečiv. Doteraz bolo zaznamenané široké spektrum vplyvov vrátane účinkov na oocyty a dozrievanie semenníkov, vplyv na fyziológiu a správanie hmyzu, účinky na dekompozíciu hnoja, inhibíciu alebo stimuláciu rastu vodných rastlín a rias a vývoj antibakteriálnej rezistencie v pôdnych mikroóboch (Boxall, 2004).

Koncentrácie, ktoré sa dostanú do organizmov, sa premietajú do účinkov, ktoré možno klasifikovať do troch skupín. Prvá skupina zahŕňa normálne toxické účinky typické pre všetky xenobiotiká. Môžu sa vyskytnúť na ľubovoľnej úrovni biologickej hierarchie: na bunkách, orgánoch, organizmoch, populačných ekosystémoch. Účinky druhej skupiny, typické pre antibiotiká aj anthelmintiká, súvisia s vývojom rezistencie. Príčiny zmien sú dlhodobé, vysoko nezvratné a vyvíjané pri veľmi nízkych koncentráciách. Účinky tretej skupiny zahŕňajú tzv. endokrinné disruptory, t.j. chemikálie, ktoré môžu narušiť normálnu funkciu hormónov, opäť pri veľmi nízkych dávkach (Bártíková et al., 2016).

Znalosť fytoxicity je dôležitá, pretože niektoré rastlinné druhy môžu byť citlivé na xenobiotické účinky a výskyt liečiv v určitých oblastiach môže viesť k zníženej biodiverzite (Bártíková et al., 2016).

Možnosti, ako sa tieto rezíduá môžu dostať až k človeku zahŕňajú napríklad:

- spotrebu plodín, ktoré majú akumulované látky z pôdy v dôsledku expozície kontaminovaným hnojom a kalom;
- prostredníctvom potravinového reťazca konzumáciu potravín z hospodárskych zvierat, ktoré majú akumulované veterinárne lieky alebo konzumáciu rýb vystavených liečbe používanej v akvakultúre (Boxall et al., 2006).

2.4.3. MOŽNOSTI ZNIŽOVANIA KONTAMINÁCIE

Spôsoby k zníženiu množstva veterinárnych liečiv uvoľňovaných do prostredia:

- separácia liečených zvierat od neliečených
- správne odstraňovanie nepoužitých liečiv a kontajnerov/nádob
- skladovanie kalov (napríklad tylosín sa degraduje veľmi rýchlo počas skladovania kalov) môže byť mechanizmom k zníženiu uvoľňovania do pôdy
- poradenstvo pre chovateľa o spôsoboch používania liečiv a chove zvierat na zníženie vystavovania životného prostredia možnými liekovými kontaminantami (napríklad zvieratá na pastvinách by nemali byť povolené pri vodných útvaroch počas X dní po podaní liečby,...) (Boxall, 2004)

Kvôli ekonomickému významu kontroly parazitov sa doposiaľ necieľové vplyvy antiparazitík považovali za prijateľné. Zvyšovanie rezistencie parazitov a začiatky poznatkov o dlhodobých účinkoch na druhy, spoločenstvá a fungovanie ekosystémov vedú k záverom, že je potrebné preskúmať udržateľnejšie prístupy využívajúce konvenčné antihelmintiká aj alternatívne metódy. Výskum potenciálnych vplyvov nových anthelmintických tried (napr. monepantel) na životné prostredie, ako aj nové spôsoby aplikácie (napríklad dlhodobो pôsobiace injekcie) sú zrejmé výskumné priority. Nie je pochyb o tom, že veterinárne anthelmintiká sú dôležité pre trvalo udržateľnú produkciu hospodárskych zvierat, ale aby sa predĺžila ich účinnosť a znížil ich vplyv na životné prostredie, mali by sa preskúmať iné stratégie. (Beynon, 2012).

2.5. SÓJA FAZUĽOVÁ - *GLYCINE MAX*

Sója fazuľová (Obr. 8) je jednoročná bylina pestovaná v subtrópoch a trópoch celého sveta (aj v teplých oblastiach Českej republiky) patriaca do čelade *Fabaceae* (Jahodář, 2011).

Sójové bôby sú jednou z hlavných základných potravín pre ľudí a poskytujú vysoko kvalitný proteín a jedlý olej. Je to jedna z najviac pestovaných plodín na svete s históriou pestovania, ktorá siaha až do 11. storočia pred naším letopočtom.



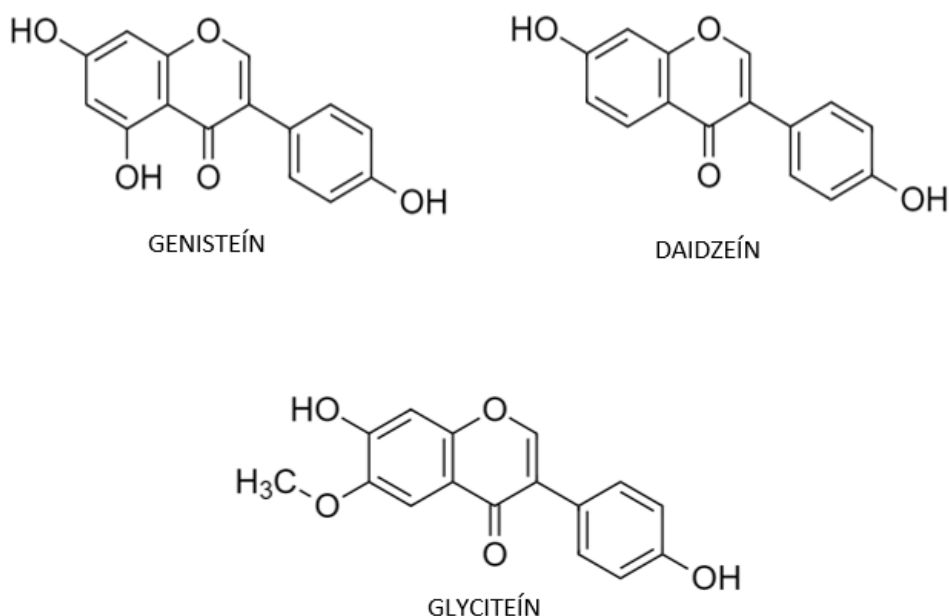
OBRÁZOK 8 SÓJA FAZUĽOVÁ - *GLYCINE MAX* (Soy Plant, n.d.)

Sekundárne listy sú trojpočetné a striedavé, príležitostne sú prítomné listy zložené zo štyroch alebo viacerých lístkov. Koreňový systém sa skladá z hlavného koreňa z ktorého sa vynára bočný koreňový systém. Rastliny väčšiny kultivarov sú pokryté jemnými trichómami. Struk je rovný alebo mierne zakrivený, líši sa dĺžkou od dvoch do siedmich centimetrov. Tvar semena, zvyčajne oválny, sa môže líšiť medzi kultivarmi od takmer guľatého až pozdĺžneho a splošteného (CFIA, 2012).

Sója sa pestuje primárne na produkciu semien, má široké využitie v potravinárskom a priemyselnom sektore a predstavuje jeden z hlavných zdrojov jedlých rastlinných olejov a bielkovín na použitie v krmivách pre hospodárske zvieratá (CFIA, 2012). Potraviny zo sóje sú už dlho uznávané ako zdroje vysoko kvalitných bielkovín a zdravého tuku, avšak za posledných 25 rokov sa tieto potraviny intenzívne skúmali

kvôli ich úlohe pri prevencii a liečbe chronických ochorení. Existujú napríklad dôkazy o znížení rizika koronárnej choroby srdca a rakoviny prsníka a prostaty.

Väčšina zamerania na sójové výrobky je preto, že sú jedinečne bohatými zdrojmi izoflavonoidov. Izoflavonoidy sa vyskytujú v sójových boboch takmer výlučne ako glykozidy, ale po požití sa cukor hydrolyzuje, čo umožňuje absorpciu. Tri izoflavonoidy genisteín, daidzeín a glyciteín (štruktúra uvedená na Obr. 9) a ich príslušné glykozidy predstavujú približne 50 %, 40 % a 10 % celkového obsahu izoflavonoidov v sójových bôboch (M Messina & Messina, 2000).



OBRÁZOK 9 ŠTRUKTÚRA IZOFLAVONOIDOV (GENISTEÍNU, DAIDZEÍNU A GLYCITEÍNU) VYSKYTUJÚCICH SA V SÓJI (NAKRESLENÝCH POMOCOU CHEMDRAW)

Izoflavonoidy majú chemickú štruktúru podobnú hormonálnemu estrogénu, táto štruktúra im preto umožňuje viazať sa na estrogénové receptory (ER) -ER α a ER β . Z tohto dôvodu sú za určitých podmienok schopné vyvolať účinky podobné estrogénu a tak sa označujú ako fytoestrogény. Preferencia izoflavonoidov pre ER β je primárny dôvod, pre ktorý sú izoflavonoidy považované za schopné mať selektívne účinky na tkanivo a dôvod, prečo sú klasifikované ako selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERMs). V tkanivách, ktoré majú estrogénové receptory, SERM vykazujú v niektorých prípadoch účinky podobné estrogénu, avšak v iných, účinky nevykazujú

vôbec alebo môžu byť tiež antiestrogénne (M Messina & Messina, 2000; Mark Messina, 2016).

Sója fazuľová ako poľnohospodárska plodina patriaca medzi najviac pestované plodiny, je hnojená a prostredníctvom hnoja liečených zvierat sa môže dostať do kontaktu s anthelmintikami. Tieto liečivá tak môžu vyvolať v rastline stres a ovplyvniť antioxidantný systém.

3. CIELE PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť vplyv anthelmintík IVM a FBZ na aktivitu a expresiu vybraných antioxidantných enzýmov rastliny sóje fazuľovej (*Glycine max*).

- Vypestovanie rastlinných kultúr *Glycine max* a ich kultivácia/inkubácia s anthelmintikami FBZ a IVM
- Spracovanie rastlinného materiálu (koreň, list, struk, semeno) na subcelulárne frakcie
- Stanovenie koncentrácie bielkovín
- Meranie aktivity vybraných antioxidantných enzýmov u kontrolných a anthelmintikami ovplyvnených rastlín
- Meranie géovej exprese vybraných antioxidantných enzýmov u kontrolných a anthelmintikami ovplyvnených rastlín
- Vyhodnotenie a štatistické spracovanie výsledkov

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. CHEMIKÁLIE

Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) (Sigma Aldrich)

1-chlór-2,4-dinitrobenzén (CDNB) (Penta)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich)

FBZ (Sigma Aldrich)

GSH (Biochemica)

Glutatión disulfid (Sigma Aldrich)

Hovädzí sérový albumín (BSA) (Sigma Aldrich)

IVM (Sigma Aldrich)

AsA (Sigma Aldrich)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma Aldrich)

Nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný (NADPH) (Sigma Aldrich)

Polyvinylpyrrolidon (PVP) (Sigma Aldrich)

4.2. PRÍSTROJE

Analytické váhy, Sartorius

Autokláv, H+P Labortechnik Steam sterilizer Varioklav 75 T

Automatické pipety Eppendorf

Centrifúga, Biofuge Stratos Heraeus

Laminárny box, Holten Laminair model 1.2

Magnetické miešadlo, IKA Color Squid Wildcat Stirrer

NanoDrop spektrofotometer ND-1000

pH meter, WTW InoLab

Prístroj pre Real-time PCR – QuantStudio 6 Flex

Spektrofotometer, TECAN Infinite M200

Thermomixer, Eppendorf comfort

Trepačka, MS2 Minishaker IKA

Ultrazvukový homogenizátor, Bandelin Sonoplus HD 2070

4.3. PROGRAMY

Počítačový program i-control

Microsoft Excel

GraphPad Prism 8.0.2 – štatistické spracovanie metódou one-way ANOVA, signifikantne významný rozdiel s hodnotou $p < 0,05$

4.4. ZÁSObNÉ ROZTOKY

Príprava pufov, ktoré boli využité pri príprave subcelulárnych frakcií :

Zásobný pufer (50 mM Na-fosfátový pufer s pH 7,0)

500 ml 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ tj. 8,95 g / 500 ml

250 ml 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tj. 1,95 g / 250 ml

Jednotlivé roztoky boli pripravené do odmerných baniek a následne po rozpustení zlievané za stáleho miešania na magnetickej miešačke za kontroly pH do požadovanej hodnoty $\text{pH}=7$.

Pred izoláciou subcelulárnych frakcií z rastlín bol pufer upravený:

200 ml 50 mM Na-fosf. pufru, pH 7

2 g PVP

77 mg dithiothreitol (DTT)

6 mg EDTA

4.5. PRÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

4.5.1. KULTIVÁCIA RASTLÍN V SKLENÍKU

Príprava biologického materiálu = pestovanie sóje a jej následne zalievanie roztokmi vybraných anthelmintík – IVM a FBZ prebiehalo v Laboratóriu rastlinných biotechnológií na Ústave experimentálnej botaniky Akadémie vied Českej republiky v Prahe.

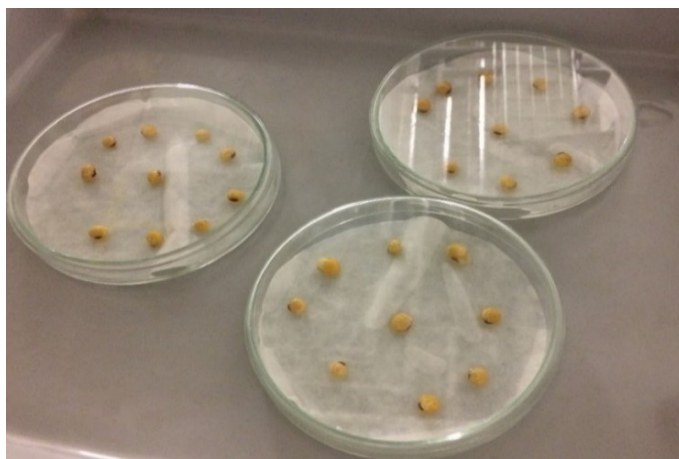
Pre pestovanie rastlín v skleníku boli semienka pripravené nasledujúcim spôsobom:

Semienka sóje sa spolu s 1 ml 70% etanolu 2 minúty pretrepávali. Po odpipetovaní etanolu bol pridaný 1 ml 10% SavaOriginal (4,7% chlórnan sodný) a pretrepávali sa 10 min. Následne po odpipetovaní Sava sa 3 krát prepláchli destilovanou vodou a umiestnili na filtračný papier do Petriho misky. Semienka boli zaliate 5 ml zriedovacej vody, uzavreté parafilmom a umiestené do tmavého boxu, kde boli kultivované pri kontrolovaných podmienkach (Obr. 10). Zriedovacia voda bola tvorená 4 zásobnými roztokmi solí.

Zloženie zásobných roztokov pre zriedováciu vodu:

- Zásobný roztok č.1: 117,6 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (p.a) sa rozpustí a doplní do 1 litra destilovanou vodou.
- Zásobný roztok č.2: 49,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a) sa rozpustí a doplní do 1 litra destilovanou vodou.
- Zásobný roztok č.3: 25,9 g NaHCO_3 sa rozpustí a doplní do 1 litra destilovanou vodou.
- Zásobný roztok č.4: 2,3 g KCl (p.a) sa rozpustí a doplní do 1 litra destilovanou vodou

Druhý pokus bol prevedený bez ošetrovania Savom a etanolom a vzhľadom na životnosť semienok bol vyhodnotený ako lepší postup.



OBRÁZOK 10 SEMIENKA *GLYCINE MAX* NA FILTRAČNOM PAPIERI

Po piatich dňoch, kedy bola väčšina semienok čiastočne vyklíčená, boli premiestnené do svetelného boxu (25 °C) a po ďalších dvoch dňoch následne naklíčené semienka (Obr. 11) nasadené do zeminy (po jednom do samostatných kvetináčov) a umiestnené do skleníku.



OBRÁZOK 11 SEMIENKA SÓJE PO 7 DŇOCH (PRED PRESADZOVANÍM DO KVETINÁČOV)

Po 7 dňoch v skleníku bolo rastúcich 21 rastlín z 25. Po 45 dňoch od zasadenia boli rastliny rozdelené po šesť kusov do troch skupín (každá oddelenú tácku-kontrolné rastliny, rastliny zalievané IVM, rastliny zalievané FBZ (Obr. 12) a zaliatie 10 μ M roztokom anthelmintika v 1/5 Hoeglandovu médiu alebo médiom s DMSO (kontrolné rastliny). Rastliny boli takto ošetrované každé 2 dni.

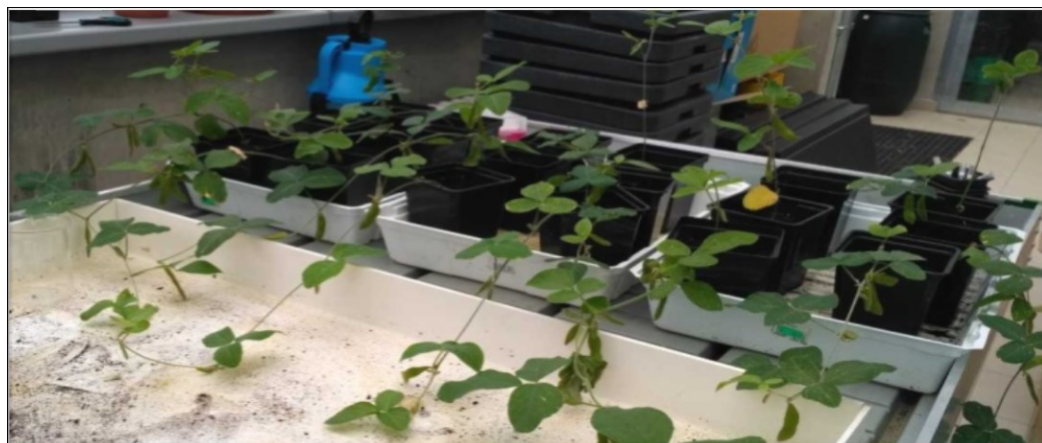
Roztoky anthelmintík použité na zalievanie rastlín:

:10 μ M =FBZ (2,99 mg/l tj 1 ml zásobného roztoku o koncentrácii 2,99 mg/10 ml sa pridal do 100 ml média na zálievku kvetináča)

:10 μM =IVM (8,75 mg/l tj. 1 ml zásobného roztoku o koncentrácií 8,75mg/10 ml sa pridal do 100 ml média na zálievku kvetináča)

Navážky anthelmintík boli rozpustené v 300 μl DMSO a doplnené vodou na požadovanú koncentráciu.

Po 2 mesiacoch boli zozbierané korene rastliny, listy a plody (pri príprave frakcií rozdelené na struk a semienko) a zmrazené ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) do prípravy subcelulárnych frakcií. Série zo 6 rastlín – FBZ, IVM a kontrolná skupina.



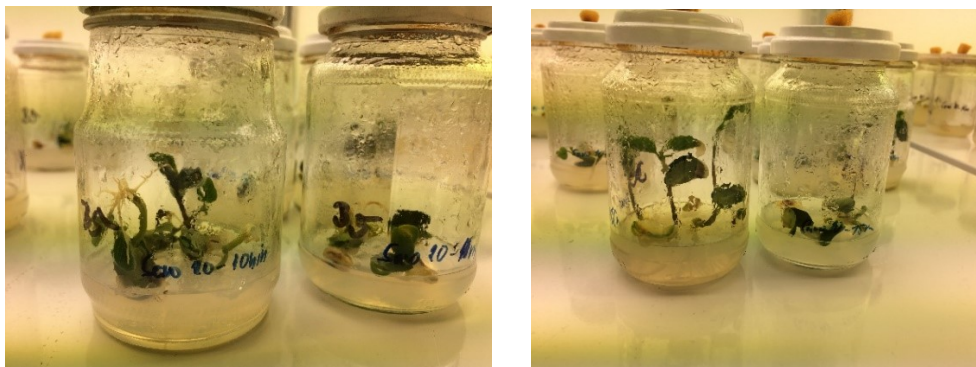
OBRÁZOK 12 RASTLINY ROZDELENÉ DO 3 SKUPÍN : KONTROLNÁ SKUPINA, SKUPINA S IVM, SKUPINA S FBZ

4.5.2. KULTIVÁCIA RASTLÍN V STERILNÝCH PODMIENKACH

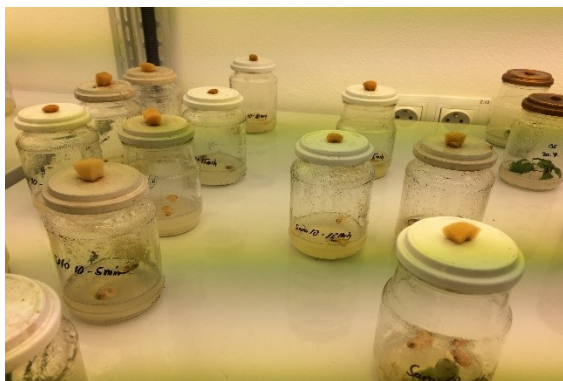
Súčasťou práce bola tiež príprava regenerantov sóje v sterilných podmienkach. Pôvodne boli semienka sóje nasadené na pripravené kultivačné média typu MS-H a B5 (Obr. 13). Vzhľadom na to, že pri médiu B5 sa im darilo omnoho lepšie (Obr. 14), boli pripravené média B5 s anthelmintikami, do ktorých mala byť následne sója presadená. Kultivačné média boli pripravované podľa návodu navážením jednotlivých zložiek, médium B5 podľa Gamborga, 1968 a Murashige-Skoog médium -H (bez rastových hormónov) podľa Murashige & Skoog, 1962. Po upravení pH boli média rozliate do vysterilizovaných sklenených nádob a umiestnené do autoklávu. Po vychladnutí boli do nich v aseptickom prostredí v laminárnom boxe zasadené semienka. Semienka boli ošetrené viacerými spôsobmi s cieľom nájsť čo najvhodnejšiu kombináciu. Boli použité roztoky SavaOriginal dvoch rôznych koncentrácií – 10% a 20% a boli použité 4 rôzne doby pôsobenia Sava: 5, 10, 15 a 20 min. Po uplynutí stanoveného času boli semienka

opláchnuté v sterilizovanej vode a vložené do médií. Následne umiestnené do svetelnej kultivačnej miestnosti.

Po druhom presadení však väčšina rastlín splesnivala a nebolo možné ich použiť k stanoveniu.



OBRÁZOK 13 KULTIVÁCIA NA MÉDIU B5 BEZ ANTHELMINTIKA PO 5 DŇOCH



OBRÁZOK 14 KULTIVÁCIA NA MÉDIU MS -H PRE POROVNANIE S MÉDIOM B5

4.6. PRÍPRAVA SUBCELULÁRNÝCH FRAKCIÍ

Jednotlivé typy rastlinného materiálu, vždy zo 6 rastlín dokopy (koreň, list, struk a semienko + IVM/FBZ/KON) boli rozdrvené a homogenizované pomocou trecej misky, tĺčika a suchého ľadu. Následne bol zvážený materiál prevedený do centrifugačnej kyvety, zaliaty pufrom k izolácii subceluráných frakcií (postup prípravy uvedený v kapitole 4.4.) s pomerom hmotnosti materiálu k objemu pufru 1:3 (1 gram materiálu na 3 ml pufru), zhomogenizovaný ultrazvukovým homogenizátorom a umiestnený do centrifúgy (stočenie pri 20 000 g, 30 min pri 4 °C). Vzniknutý supernatant bol v chladiacej miestnosti ešte premiešaný na magnetickej miešačke a rozpipetovaný po 0,5 ml do jednotlivých skúmaviek, následne zmrazený (-80 °C) do použitia k meraniu aktivity

enzýmov. Príprava materiálu na polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) je uvedená v kapitole 4.9.1.

4.7. STANOVENIE KONCENTRÁCIE BIELKOVÍN PODĽA BRADFORDOVEJ

Koncentrácia proteínov vo vzorkách bola stanovená metódou podľa Bradfordovej. Metoda je založená na princípe reakcie farbiva CBBG a proteínu. Po naviazaní na proteín dôjde k zmene zafarbenia (červeno-hnedá forma sa mení na modrú) a maximum absorbcie sa po naviazaní mení z 465 nm na 595 nm. Intenzita zafarbenia je priamo úmerná koncentrácii proteínov (Jones et al., 1989).

Ako štandard, z ktorého bola vytvorená kalibračná krivka bol použitý roztok BSA o koncentrácii 2 mg/ml. Koncentrácia štandardov bola v rozmedzí 0 - 1400 µg/ml (Tabuľka 1).

TABUĽKA 1 PRÍPRAVA ROZTOKOV ŠTANDARDOV KU KALIBRAČNEJ KRIVKE

	Koncentrácia	Objem roztoku	Objem pufru
		BSA (2 mg/ml)	
1	0 µg/ml	0 µl	500 µl
2	200 µg/ml	50 µl	450 µl
3	400 µg/ml	100 µl	400 µl
4	600 µg/ml	150 µl	350 µl
5	800 µg/ml	200 µl	300 µl
6	1000 µg/ml	250 µl	250 µl
7	1200 µg/ml	300 µl	200 µl
8	1400 µg/ml	350 µl	150 µl

Stanovenie bolo prevedené na mikrotitračnej doštičke GAMA, do jednotlivých jamiek bolo napipetované 5 µl vzorku bielkovín a následne multikanálovou pipetou 200 µl farbiva CBBG. U slepého vzorku sa namiesto bielkoviny použilo 5 µl pufru. Následne bola zmeraná absorbcia pri 595 nm na prístroji Tecan.

4.8. STANOVENIE AKTIVITY ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV

4.8.1. STANOVENIE AKTIVITY KATALÁZY

Princíp metódy je založený na tvorbe žltého komplexu molybdenanu amonného s peroxidom vodíka. Jeho absorbancia je meraná na mikrotitračných doštičkách pri vlnovej dĺžke 405 nm (Góth, 1991). Zloženie jednotlivých blankov a vzorky je uvedené v Tabuľke 2.

Postup prípravy jednotlivých používaných roztokov:

1. Sodno-draselný fosfátový pufer; 60 mM, pH 7,4:

postupné zmiešavanie 500 ml roztoku pripraveného rozpustením 10,74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v redestilovanej vode s 500 ml roztoku 4,08 g KH_2PO_4 v redestilovanej vode, pri meraní pH aby výsledná hodnota bola rovná 7,4

2. H_2O_2 ; 6,5 mM :

14,78 μl 30 % H_2O_2 v 20 ml sodno-draselného pufru

3. Molybdenan amonný; 32,4 mM :

navážených 0,8 mg molybdenanu amonného ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) rozpustiť v 20 ml H_2O

TABUĽKA 2 ZLOŽENIE JEDNOTLIVÝCH BLANKOV (1-3) A VZORKY

	<i>Blank 1</i>	<i>Vzorka</i>	<i>Blank 2</i>	<i>Blank 3</i>
1	100 μl H_2O_2	100 μl H_2O_2	100 μl H_2O_2	100 μl pufru
2	100 μl molybd	20 μl biol. f.	20 μl pufru	20 μl pufru
3	inkubácia pri 25 °C 1 minútu			
4	-	100 μl molybd.	100 μl molybd.	100 μl molybd.
5	nechať stáť po dobu 1 minúty			
6	20 μl biol. f.	-	-	-
7	zmerať absorbanciu pri 405 nm			

Všetko až na biologickú frakciu pipetované multikanálovou pipetou, biologická frakcia pipetovaná čo najrýchlejšie – po častiach, následne ihneď zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 405 nm a teplote 25 °C.

Vzorec na výpočet aktivity :

$$\text{Aktivita} = (\text{Abl1} - \text{Avz}) / (\text{Abl2} - \text{Abl3}) \cdot 32,5 \quad (\mu\text{mol}/\text{min})$$

Avz – absorbancia vzorku
 Abl1 – absorbancia blanku 1
 Abl2 – absorbancia blanku 2
 Abl3 – absorbancia blanku 3

4.8.2. STANOVENIE AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY

Na meranie aktivity SOD bol použitý set SOD AssayKit-WST (Sigma Aldrich), ktorý využíva vo vode rozpustnú Dojinho tetrazoliovú soľ WST-1, ktorej redukciou so superoxidovým aniontom sa vytvára formazanové farbivo (“SOD Protocol,” n.d.).

Používané zásobné roztoky z príslušného setu na stanovovanie SOD:

- Roztok tetrazoliovej soli rozpustnej vo vode (WST): 1 ml WST zriedený 19 ml pufrom na riedenie zo setu SOD
- Pracovný roztok enzýmov (EWS): 15 µl roztoku enzýmu, zriedený pufrom na riedenie
- Pufer na riedenie

Po napipetovaní vzoriek a jednotlivých reagensov podľa Tabuľky 3, bola doštička inkubovaná 20 min pri teplote 25 °C. Následne bola zmeraná absorbancia pri 450 nm na GAMA mikrotitračnej doštičke s vypuklým dnom.

TABUĽKA 3 MNOŽSTVO JEDNOTLIVÝCH ROZTOKOV PRE VZORKU A BLANK1-3

	Vz	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Biol. frakcia	20 µl	-	20 µl	-
Redestilovaná H₂O (ddH₂O)	-	20 µl	-	20 µl
WST	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Zried'ovací p.	-	-	20 µl	20 µl
EWS	20 µl	20 µl	-	-

Vzorec pre výpočet aktivity :

$$c = [(A_{BL1} - A_{BL3}) - (A_{Vz} - A_{BL2})] / \epsilon \cdot l$$

$$A = c \cdot V \cdot 50 \cdot 10^9 / t$$

c = koncentrácia

A_{Vz} = absorbanca vzorky

A_{BL1} = absorbanca Blanku 1

A_{BL2} = absorbanca Blanku 2

A_{BL3} = absorbanca Blanku 3

ϵ = extinkčný koeficient ($3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l = výška reakčnej zmesi v jamke (0,9 cm)

A = aktivita

V = objem reakčnej zmesi (0,00024 l)

T = čas (20 min)

4.8.3. STANOVENIE AKTIVITY ASKORBÁTPEROXIDÁZY

Metóda je založená na oxidácii AsA v prítomnosti peroxidu vodíka na askorbát. Zmena absorbanca bola meraná pri 290 nm v UV transparentnej mikrotitračnej doštičke po dobu 5 min. Rozdiel absorbanca za čas použitý pre výpočet aktivity bol zistený z oblasti lineárneho poklesu. Špecifická aktivita bola vyjadrená na mg proteínu (Nakano & Asada, 1987; Ne Vanacker et al, 1998).

Do každej jamky bolo napipetované 20 μl biologickej frakcie a následne multikanálovou pipetou 144 μl 50 mM fosfátového pufru, 18 μl 6 mM roztoku AsA (roztok pripravený z 9 ml vody; 1 ml 0,5 M fosfátového pufru a 10 mg AsA) a 18 μl 2 mM roztoku peroxidu vodíka (pripravený z 9 ml vody, 1 ml 0,5 M fosfátového pufru a 2 μl peroxidu vodíka)

4.8.4. STANOVENIE AKTIVITY PEROXIDÁZY

V priebehu reakcie, ktorá je katalyzovaná POX, je rozkladaný peroxid vodíka a dvojica pyrokatechol-anilin slúži ako vodíkový donor pre stanovenie aktivity POX. Anilin-pyrokatechol sa mení na produkt [4-(fenylamino)benzen-1,2-diol] s ružovým zafarbením. Prírastok tohto produktu je zaznamenávaný spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 510 nm (Molaei Rad et al., 2007).

Používané zásobní roztoky a ich postup prípravy :

1. 0,2 M sodno-fosfátový pufer (pH=7,00)

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (35,8 g rozpustiť v 500 ml redestilovanej vody) a roztok NaH_2PO_4 (7,8 g do 250 ml redestilovanej vody) zlievať do cieľovej hodnoty pH 7

2. H_2O_2 (1,7 mM)

3,87 μl (30 % zásobného roztoku) do 20 ml pufru

3. Substrát

0,1872 g pyrokatecholu + 2,28 μl anilinu + 10 ml pufru (množstvo na 1 doštičku)

Z dôvodu nestálosti pyrokatecholu je nutné ho nariediť tesne pred použitím a nechávať ho v tmavých miestach.

Do každej jamky bolo napipetované 90 μl substrátu (anilin a pyrokatechol v pufri) a 100 μl H_2O_2 . Doštička sa nechala predinkubovať 4 min pri 25°C v thermomixéri. Nasleduje prídanie 10 μl biologickej frakcie (0,1 M sodno-draselný fosfátový pufer u slepého vzorku) čo vedie k naštartovaniu reakcie. Vzorky sa pridávali postupne aby nedošlo k priveľmi dlhým časovým rozdielom. Tvorba produktu je sledovaná v oblasti lineárneho rastu absorbancie pri vlnovej dĺžke 510 nm po dobu 7 min v minútových intervaloch. K výpočtu bol použitý molárny extinkčný koeficient produktu ($\epsilon = 5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.8.5. STANOVENIE AKTIVITY GLUTATIÓNPEROXIDÁZY

V priebehu reakcie, ktorá je katalyzovaná GPX je GSH oxidovaný na GSSG. Tento vzniknutý GSSG je priebežne redukovaný pomocou GR, ktorá zabezpečuje konštantnú hladinu GSH. Zároveň je spotrebovaný NADPH, čo je fotometricky monitorované poklesom absorbancie pri 340 nm (Handy et al., 2009).

Do všetkých jamiek doštičky bolo napipetovaných 50 μl vzorku (výnimku tvoria jamky so slepou vzorkou, ktoré namiesto cytosolu obsahujú 50 μl pufru) a 130 μl mastermixu obsahujúceho:

Pufer (0,1 M K-fosfátový pufer, pH=7,00)	10,8 ml
EDTA (20 mM)	1,2 ml
GR (10 U/ml)	1,2 ml
GSH (103 mM)	2,4 ml

Po predinkubácii (10 min pri 25 °C na Thermomixéri) bolo multikanálovou pipetou pridaných 10 μl 4 mM NADPH a následne bola sledovaná spotreba NADPH (nezávislá na hydroperoxide) po dobu 5 min. Reakcia bola naštartovaná prídanim 10 μl 70 % t-butyl

hydroperoxidu taktiež pomocou multikanálovej pipety a bol sledovaný pokles absorbancie pri 340 nm po dobu 5 min.

4.8.6. STANOVENIE AKTIVITY GLUTATIÓNREDUKTÁZY

Princíp metódy je založený na premene GSSG na GSH. Súčasne s touto premenou dochádza k oxidácii NADPH, ktorého spotreba je sledovaná pomocou poklesu absorbancie meranej pri 340 nm po dobu 6 minút na Tecane (Carlberg & Mannervik, 1985).

Do jamiek GAMA doštičky bola pipetovaná vzorka o objeme 50 μ l (každá vzorka 5 krát) alebo pufer – slepá vzorka. Následne tesne pred meraním, multikanálovou pipetou bol pridaný mastermix (150 μ l), ktorý na 1 doštičku obsahoval 6 ml 0,1 M K-fosfátového pufru s pH 7,00; 4,8 ml 5 mM roztoku EDTA; 6 ml 4 mM roztoku GSSG a 1,2 ml 2,5 mM roztoku NADPH.

Zmena absorbancie bola sledovaná pri 340 nm po dobu 6 minút v minútových intervaloch. K výpočtu bola použitá zmena absorbancie za minútu zistená v oblasti lineárneho poklesu.

4.8.7. STANOVENIE AKTIVITY GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZY

Meranie aktivity GST je založené na tvorbe konjugátu GSH s CDNB. Tento konjugát má absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 340 nm (Ye & Zhang, 2001).

Do doštičiek GREINER s plochým dnom bolo napipetované 6 μ l vzorky-cytosolu (6x). V každom stĺpci boli tiež jamky so slepou vzorkou, ktoré obsahovali 6 μ l pufru. Následne bolo k vzorkám multikanálovou pipetou napipetované 194 μ l mastermixu, ktorý bol pripravený tesne pred stanovením z dôvodu nestability. Mastermix na 1 doštičku obsahoval 4 ml roztoku 5,15mM GSH; 0,4 ml 51,5mM roztoku CDNB a 15,6 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru. Zmena absorbancie bola meraná na prístroji Tecan pri teplote 25 °C pri 340 nm, 6 krát po minútových intervaloch. Pre výpočet aktivity bol použitý rozdiel absorbancie za čas ($\Delta A/\text{min}$), ktorý bol zistený z oblasti lineárneho vzrastu absorbancie.

4.9. STANOVENIE EXPRESIE

Ďalším cieľom práce bolo porovnanie expresie génov určitých antioxidantných enzýmov [APX, CAT1/2, FeSOD a referenčných genov glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GADPH), aktínu alpha 3 (ACT3)] medzi kontrolnou skupinou rastlín a skupinou ovplyvnenou anthelmintikami FBZ a IVM. Vo všetkých troch skupinách rastlinného materiálu najprv prebehla izolácia ribonukleovej kyseliny (RNA), ktorá následne bola reverznou transkripciou prepísaná do komplementárnej DNA (cDNA).

4.9.1. IZOLÁCIA RNA A MERANIE KONCENTRÁCIE RNA

Po rozomletí rastlinného materiálu v trecej miske bolo do 1,5 ml skúmavky navážene 50 mg vzorku (od každého typu materiálu z 3 jednotlivých rastlín pre každú skupinu – kontrola, IVM, FBZ) a pridané 350 μ l pufru z Kitu Ribospin™. Vzorky boli označené a zmrazené pri teplote mraziaceho boxu -80 °C.

K izolácii bol využitý postup v materiáloch, ktoré boli súčasťou Kitu Ribospin™. Príprava prebiehala v laminárnom boxe s použitím rukavíc, aby sa zabránilo kontaminácii. Po rozmrazení vzorku, bol rozdrvený materiál prenesený na EzPure™ filter. V tomto kroku boli odstránené veľké časti rastlinného materiálu a väčšina genomickej DNA bola prefiltrovaná. Po centrifugácii pri izbovej teplote (30 s; nad 10,000 g) bol supernatant premiestnený do nových 1,5 ml mikroskúmaviek, ktoré boli súčasťou kitu. Po pridaní 350 μ l 70% etanolu a premiešaní bola táto zmes premiestnená na minispin kolónku. Po opätovnej centrifugácii (30 s, 10,000 g, izbová teplota) bol odstránený filtrát a kolónka zavedená do pôvodnej skúmavky. Po pridaní 500 μ l pufru z Kitu Ribospin™, bol proces centrifugácie a odstránenia filtrátu zopakovaný. Ďalším krokom bolo pridanie 70 μ l reakčnej zmesi deoxyribonukleázy (DNázy) I do stredu minispin kolónky, k odstráneniu novej nežiaducej DNA. Táto reakčná zmes bola pripravená z 2 μ l DNázy a 70 μ l pufru z Kitu Ribospin™. Po inkubácii pri izbovej teplote po dobu 10 minút bol opäť pridaný pufer (500 μ l), ktorý sa nechal pôsobiť 2 minúty na inaktiváciu DNázy I a premytie. Opäť bola vykonaná centrifugácia rovnako ako v predošlých prípadoch. Následne bol pridaný pufer z Kitu Ribospin™ (500 μ l) a opäť centrifugácia, následne opakovanie tohto kroku. Pre odstránenie rezíduí pufru sa kolónka centrifugovala ďalšiu minútu a po tomto kroku sa previedla do nových 1,5 ml skúmaviek. Na stred membrány kolónky bolo pridané 30 μ l Nuclease-free vody

a stočenie. Vzorka zo skúmavky obsahujúca vyčistenú a izolovanú RNA sa ihneď využila k zmeraniu koncentrácie RNA na spektrofotometri NanoDrop. Zároveň sa zmeraním absorbancie pri 260, 280 a 230 nm overila kontaminácia DNA a fenolom.

4.9.2. REVERZNÁ TRANSKRIPCIA

Princípom reverznej transkripcie je prevedenie RNA na jednoreťazovú cDNA s použitím primeru.

Prvým krokom postupu je príprava zmesi obsahujúcej 8 μ l RNA (nariedená na 250 ng/ μ l) a 1 μ l náhodných hexamerov pipetovaných elektrickou pipetou. Po sklepnutí kvapiek a zamiešaní boli vzorky prevedené do PCR cykléru s teplotou 65 °C. Po 5 minútach boli vzorky premiestnené do mraziaceho stojanu na schladenie. Behom tohto zahrievania a chladenia bol pripravený mastermix s reverznou transkriptázou (RT). Jeho zloženie je zobrazené v Tabuľke 4.

TABUĽKA 4 ZLOŽENIE MASTERMIXU NA REVERZNÚ TRANSKRIPCIU

Mastermix RT
4 μ l pufru
2 μ l DTT
2 μ l deoxynukleotidtrifosfátov (dNTPs)
0,5 μ l RT
2,5 μ l Nuclease-free vody

Do vychladnutých skúmaviek bolo ku každej vzorke pridaných 11 μ l mastermixu RT, následne opäť stočenie a vrátené naspäť do PCR-cykléru, kde sa najprv 50 minút zahrievali na 42 °C (prebiehala syntéza cDNA) a potom 5 minút pri 80 °C (denaturácia RT). Na záver sa do zmesi pridalo 80 μ l redistilovanej H₂O, čím došlo k 5-násobnému zriedeniu pripravenej cDNA. Takto upravované vzorky boli uchovávané do nasledujúceho merania.

4.9.3. KVANTITATÍVNA POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA V REÁLNO M ČASE (qRT-PCR)

Pred vlastným meraním expresie, bola skontrolovaná účinnosť primerov. Efektívita alebo účinnosť PCR reakcie je meradlom celkovej výkonnosti reakcie. Je vyjadrovaná ako percentuálna hodnota a v praxi by sa účinnosť mala pohybovať v rozmedzí 90 % až 110 %. Účinnosť môže byť znížená napr. prítomnosťou etanolu, EDTA alebo naopak zvýšená pri chybnom pipetovaní. Pri výpočte účinnosti sa využíva smernica kalibračnej krivky, ktorá znázorňuje závislosť C_T hodnoty (os y) na koncentrácií cDNA zriedovacej rady v logaritmickom prevedení (os x). Pre zostrojenie krivky a výpočet účinnosti bola využitá zmiešaná cDNA, ktorá obsahovala 20 μ l z každej pripravenej cDNA. Z tohto zmiešaného vzorku bola následne pripravená riediaci rada:

Do prvej skúmavky bolo pipetované 10 μ l zmiešanej cDNA a 40 μ l ddH₂O. Z tejto premiešanej zmesi sa odobralo 10 μ l, ktoré boli následne rovnako nariadené. Tento krok bol opakovaný ešte 3-krát. Takto bolo pripravených 5 rôznych koncentrácií, ktoré boli následne v duplikátoch pipetované do 96 jamkovej PCR doštičky.

Každá jamka obsahovala celkovo 20 μ l: 15 μ l reakčnej zmesi (špecifickej pre každý primer) a 5 μ l cDNA vzorky/vody.

Zloženie reakčnej zmesi:

10 μ l MasterMixu

0,8 μ l (0,4 μ l forward +0,4 μ l reverse) nariadeného primeru

4,2 μ l vody

Princíp PCR je podobný princípu replikácie DNA, ku ktorému dochádza v bunkách. Dvojvláknová DNA je pri vysokej teplote denaturovaná, tým sa získajú jednoreťazové vlákna slúžiace ako matrice pre špecifickú amplifikáciu toho úseku DNA, ktorý je ohraničený 2 typmi primerov a to tzv. reverse a forward primermy. Každý z nich ma inú sekvenciu a nasadá na komplementárne vlákna DNA templátu. PCR prebieha v termocykléri, čo je zariadenie ktoré dokáže rýchlo a presne meniť teplotu podľa zadania (Schmittgen & Livak, 2008).

Z výsledkov bol v prvom rade spočítaný priemer z duplikátov a urobený rozdiel medzi jednotlivými hodnotami duplikátov. Vzorky, pri ktorých rozdiel medzi dvomi hodnotami bol príliš vysoký, boli označené za nevyhovujúce a neboli použité do ďalších výpočtov.

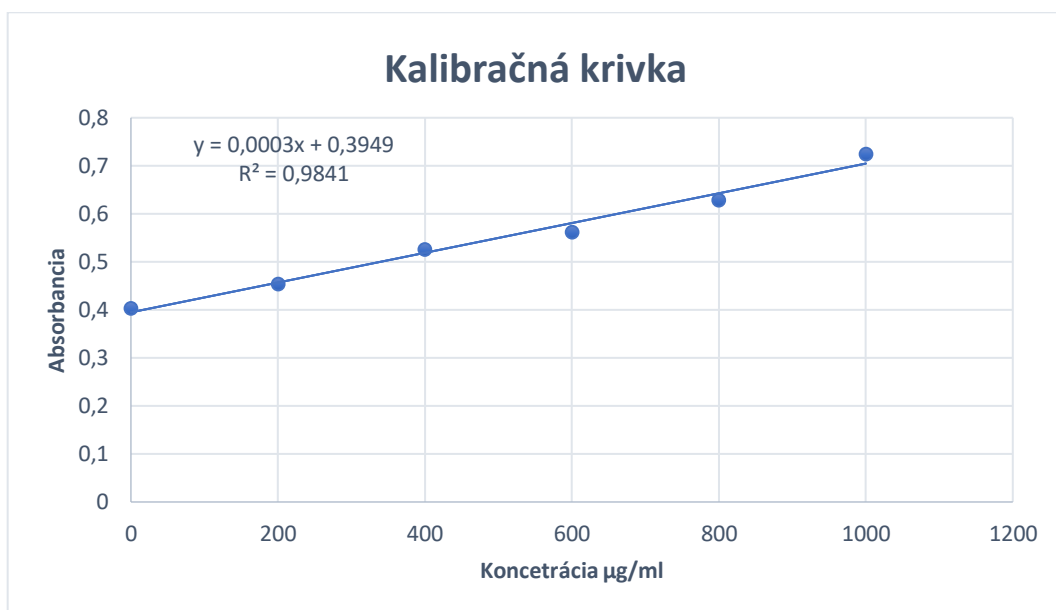
Pre výpočet relatívnej génovej expresie bola použitá relatívna kvantifikácia. Táto metóda porovnáva výsledky zisťovaných vzoriek s kalibrátorom (exogénna kontrola) aj s normalizátorom (referenčný gén). Pri tejto metóde sú najprv hodnoty C_t pre cieľový gén (APX, CAT1/2, FeSOD) v testovanej vzorke aj pre kalibrátor normalizované k referenčnému génu (GAPDH, ACT3), následne sa normalizuje ΔC_t cieľového testovaného génu ku ΔC_t kalibrátoru. Ako prvé boli vypočítané aritmetické priemery C_T hodnôt duplikátov pre všetky gény. Následne boli hodnoty dosadené do $2^{-\Delta C_t}$ (Nolan, et al., 2006; Schmittgen & Livak, 2008).

Komparatívna metóda k výsledným hodnotám vzoriek z kontrolnej skupiny vzťahuje hodnoty vzoriek ovplyvnených anthelmintikami. Indukcia génovej expresie oproti kontrolnej skupine sa prejaví zvýšenou expresiou a naopak inhibícia expresie sa prejaví zníženou expresiou oproti kontrolnej skupine.

5. VÝSLEDKY

5.1. KONCENTRÁCIA BIELKOVÍN

Koncentrácia bielkovín v subcelulárnych frakciách bola stanovená podľa postupu uvedeného v kapitole 4.7. Na základne hodnôt absorbancie roztokov štandardov pripravených podľa príslušnej tabuľky bola zostrojená kalibračná krivka, ktorá vyjadruje závislosť absorbancie na koncentrácii bielkovín (Obr. 15).



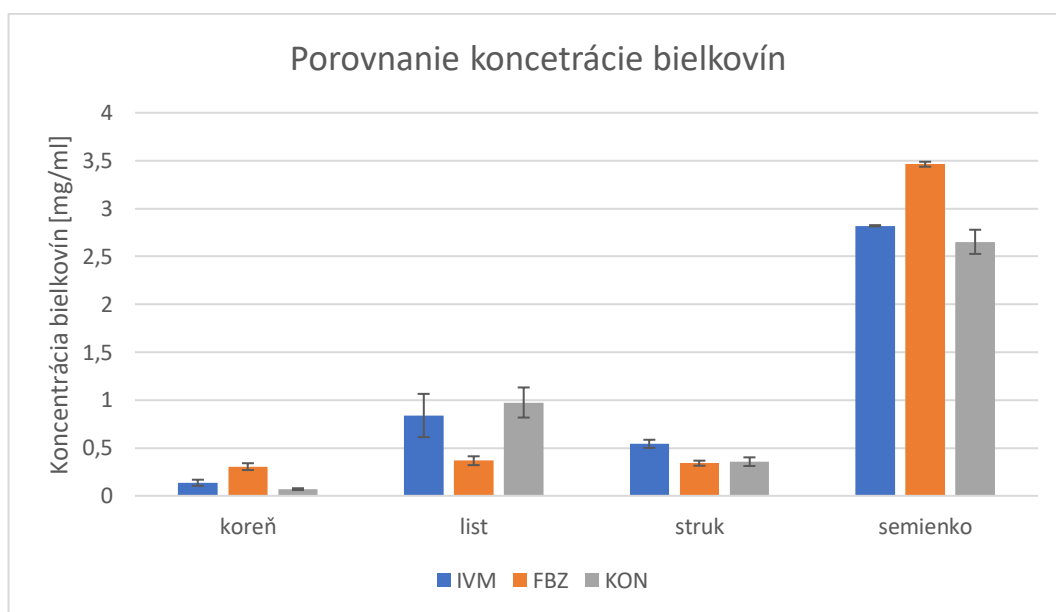
OBRÁZOK 15 ZÁVISLOSŤ ABSORBANCIE NA KONCENTRÁCII BIELKOVÍN.

HODNOTY ABSORBANCIE SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3 NEZÁVISLÝCH MERANÍ.

Pomocou rovnice lineárnej regresie ($y=0,0003x+0,3949$ s korelačným koeficientom $R^2 = 0,9841$) bola vypočítaná koncentrácia bielkovín v koreňoch, listoch, strukoch a semenkách kontrolnej skupiny vzoriek sóje, sóje kultivovanej s FBZ a sóje kultivovanej s IVM. Z výsledkov troch nezávislých meraní bola vypočítaná priemerná hodnota pre každú vzorku a tieto priemery boli použité k výpočtu špecifickej aktivity stanovovaných enzýmov. Koncentrácie bielkovín v sóji sú uvedené v Tabuľke 5, porovnanie medzi jednotlivými vzorkami zobrazuje Obr. 15.

TABUEKA 5 Koncentrácia bielkovín v sóji v jednotkách mg/ml

	<i>IVERMEKTÍN</i>	<i>FENBENDAZOL</i>	<i>KONTROLA</i>
<i>Koreň</i>	0,14 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,07 ± 0,01
<i>List</i>	0,84 ± 0,23	0,37 ± 0,05	0,97 ± 0,16
<i>Struk</i>	0,54 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,05
<i>Semienko</i>	2,82 ± 0,01	3,46 ± 0,03	2,65 ± 0,13



OBRÁZOK 16 POROVNANIE KONCENTRÁCIE BIELKOVÍN

HODNOTY KONCENTRÁCIE BIELKOVÍN SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3 NEZÁVISLÝCH MERANÍ.

Na Obr. 16 je možné vidieť, že koncentrácia bielkovín je najvyššia v semienkach rastliny. Najmenšia koncentrácia je zjavná v koreňoch.

5.2. AKTIVITA ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV

5.2.1. AKTIVITA KATALÁZY

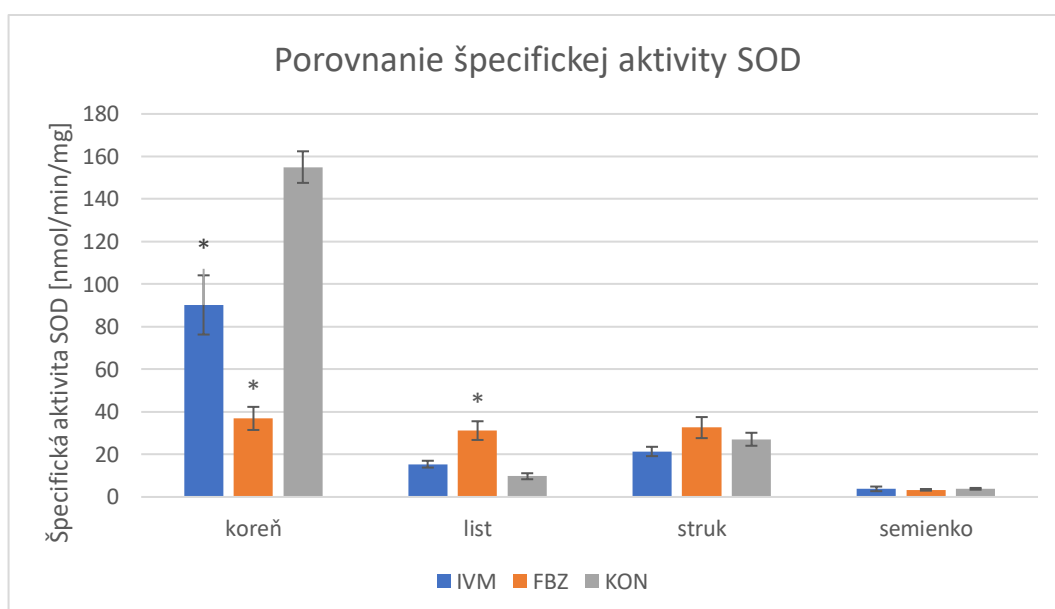
Na stanovenie aktivity CAT bola použitá metóda s molybdenanom amonným. Výpočet a stanovenie aktivity nebolo možné uskutočniť z dôvodu negatívnych hodnôt rozdielov absorbancie blankov. Je možné, že to bolo spôsobené výrazným zafarbením subcelulárnych frakcií a preto táto metóda stanovenia nebola vhodná. Vzhľadom na neúspech tejto metódy by vhodnejším stanovením mohlo byť titračné stanovenie (vhodné pre zafarbené vzorky) a kalorimetrická metóda (Anjum et al., 2016).

5.2.2. AKTIVITA SUPEROXIDDISMUTÁZY

Aktivita SOD bola zistená podľa metódy SOD assay Kit, ktorá je podrobnejšie uvedená v kapitole 4.8.2. Hodnota enzymatickej aktivity bola vypočítaná z nameranej absorbancie podľa príslušného vzorca a prepočítaná na špecifickú enzymatickú aktivitu uvedenú v jednotkách nmol/min/mg (Tabuľka 6).

TABUĽKA 6 Špecifická aktivita SOD uvedená v jednotkách nmol/min/mg

	<i>IVERMEKTÍN</i>	<i>FENBENDAZOL</i>	<i>KONTROLA</i>
<i>Koreň</i>	90,24 ± 13,92*	36,91 ± 5,43*	155,01 ± 7,42
<i>List</i>	15,41 ± 1,60	31,19 ± 4,40*	9,74 ± 1,41
<i>Struk</i>	21,38 ± 2,19	32,60 ± 4,95	27,11 ± 3,05
<i>Semienko</i>	3,80 ± 1,09	3,36 ± 0,38	3,84 ± 0,41



OBRÁZOK 17 POROVNANIE AKTIVITY SOD V JEDNOTLIVÝCH VZORKÁCH
 HODNOTY ŠPECIFICKEJ AKTIVITY ENZÝMU SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3
 NEZÁVISLÝCH MERANÍ. SIGNIFIKANTNÁ ZMENA ($P < 0,05$) OPROTI KONTROLNEJ SKUPINE JE OZNAČENÁ
 HVIEZDIČKOU (*)

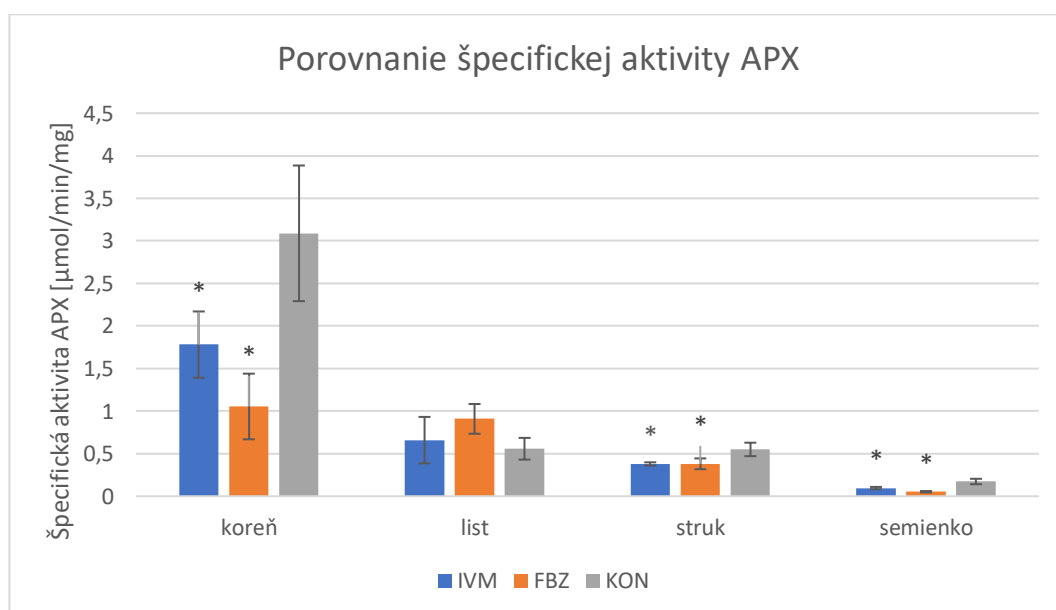
Pri grafickom znázornení rozdielu aktivít (Obr. 17) je možné vidieť, že signifikantný pokles aktivity SOD spôsobil FBZ aj IVM v koreni. V liste rastliny ovplyvnenej FBZ bol nameraný nárast aktivity voči kontrolnej skupine. Ostatné rozdiely nie sú považované za štatisticky významné.

5.2.3. AKTIVITA ASKORBÁTPEROXIDÁZY

Aktivita APX bola stanovená podľa metódy založenej na oxidácii AsA v prítomnosti peroxidu vodíka na askorbát. Absorbancia bola zmeraná pri 290 nm. Z oblasti lineárneho poklesu bol zistený rozdiel absorbancie počas 5x minútových intervalov. Výsledné špecifické aktivity pre jednotlivé vzorky sú uvedené v Tabuľke 7, grafické porovnanie zobrazuje Obr. 18.

TABUĽKA 7 Špecifická aktivita APX v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

	<i>IVERMEKTÍN</i>	<i>FENBENDAZOL</i>	<i>KONTROLA</i>
<i>Koreň</i>	1,78 ± 0,39*	1,06 ± 0,39*	3,09 ± 0,80
<i>List</i>	0,66 ± 0,27	0,91 ± 0,18	0,56 ± 0,13
<i>Struk</i>	0,38 ± 0,02*	0,38 ± 0,06*	0,55 ± 0,08
<i>Semienko</i>	0,10 ± 0,01*	0,05 ± 0,01*	0,17 ± 0,03



OBRÁZOK 18 POROVNANIE AKTIVITY APX V JEDNOTLIVÝCH VZORKÁCH
 HODNOTY ŠPECIFICKEJ AKTIVITY ENZÝMU SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3
 NEZÁVISLÝCH MERANÍ. SIGNIFIKANTNÁ ZMENA ($P < 0,05$) OPROTI KONTROLNEJ SKUPINE JE OZNAČENÁ
 HVIEZDIČKOU (*)

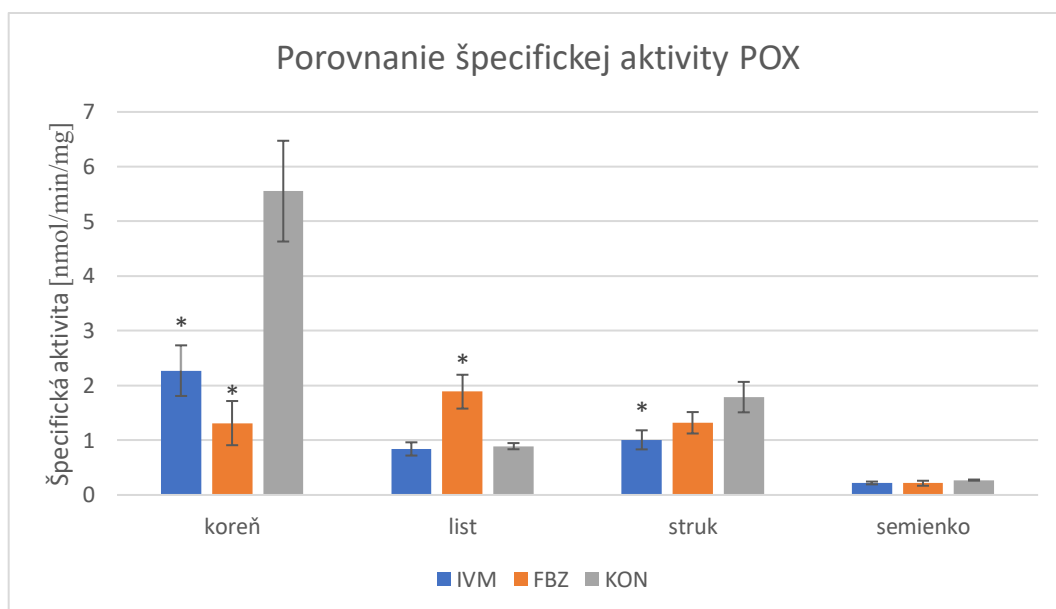
Na Obr. 18 je možné vidieť, že kultivácia s anthelmintikami ovplyvnila aktivitu APX v koreni, kde obe tieto liečivá spôsobili zníženie aktivity. Rovnako štatisticky významný pokles aktivity APX spôsobili obe anthelmintiká v strukoch aj semienkach rastlín. Aktivita nebola významne zmenená v liste.

5.2.4. AKTIVITA PEROXIDÁZY

Aktivita POX bola stanovená pomocou anilin-pyrokatecholu a metódy uvedenej v kapitole 4.8.4. Získané hodnoty enzymatickej aktivity boli následne prepočítané na miligram bielkoviny vo vzorku, čím sme získali hodnotu špecifickej aktivity enzýmu v jednotkách nmol/min/mg (Tabuľka 8).

TABUĽKA 8 Špecifická aktivita POX v jednotkách nmol/min/mg

	<i>IVERMEKTÍN</i>	<i>FENBENDAZOL</i>	<i>KONTROLA</i>
<i>Koreň</i>	1,78 ± 0,39*	1,06 ± 0,39*	3,09 ± 0,80
<i>List</i>	0,66 ± 0,27	0,91 ± 0,18*	0,56 ± 0,13
<i>Struk</i>	0,38 ± 0,02*	0,38 ± 0,06	0,55 ± 0,08
<i>Semienko</i>	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,17 ± 0,03



OBRÁZOK 19 POROVNANIE AKTIVITY POX V JEDNOTLIVÝCH VZORKÁCH
HODNOTY ŠPECIFICKEJ AKTIVITY ENZÝMU SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3
NEZÁVISLÝCH MERANÍ. SIGNIFIKANTNÁ ZMENA ($P < 0,05$) OPROTI KONTROLNEJ SKUPINE JE OZNAČENÁ
HVIEZDIČKOU (*)

Obr. 19 zobrazuje rozdiel medzi aktivitami POX v jednotlivých vzorkách. Z nameraných výsledkov je možné posúdiť, že aktivity sa signifikantne líšia v koreňoch, kde obe anthelmintiká FBZ a IVM spôsobili zníženie aktivity POX oproti kontrolnej skupine. V struku zníženie aktivity spôsobil len IVM. V liste skupiny ovplyvnenej FBZ je aktivita POX zvýšená oproti KON skupine aj oproti IVM. V semienku nie je zaznamenaná žiadna štatisticky významná zmena.

5.2.5. AKTIVITA GLUTATIÓNPEROXIDÁZY

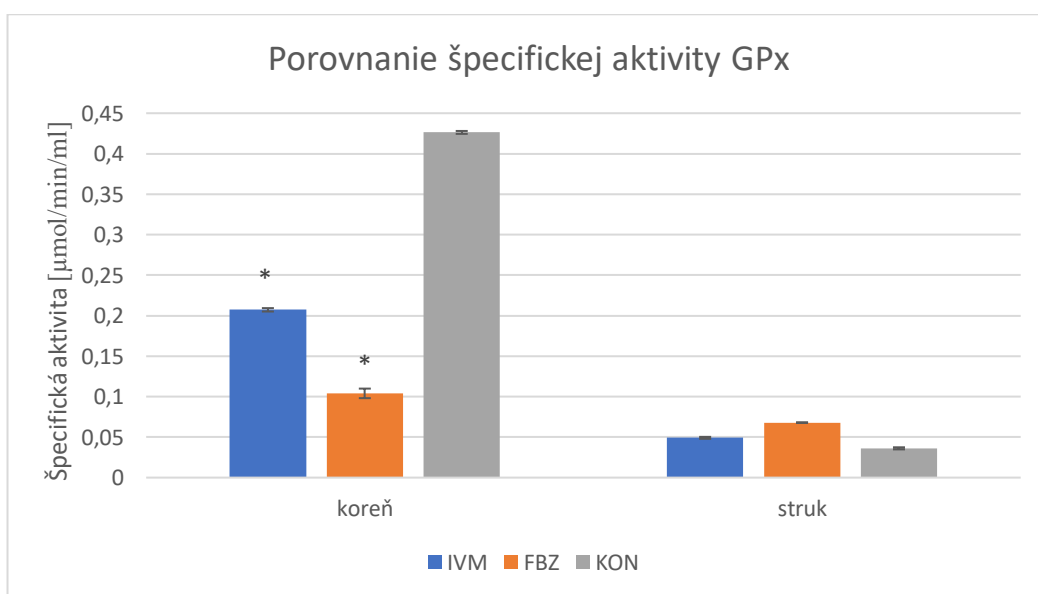
Hodnoty aktivity GPX boli merané podľa metódy uvedenej v kapitole 4.8.5. Výpočet bolo možné uplatniť len pri výpočte aktivity GPX v koreni a struku (Tabuľka 9).

Vzhľadom na negatívnosť výsledku u všetkých troch nezávislých meraní a nemožnosť výpočtu vo väčšine vzorkách, bol pre vylúčenie chybnosti metódy prevedený rovnaký skúšobný postup so vzorkami potkanej pečene (cytosol, mitochondrie). Vyšiel na rozdiel od sóje kladne.

TABUĽKA 9 Špecifická aktivita GPX v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

	<i>IVERMEKTÍN</i>	<i>FENBENDAZOL</i>	<i>KONTROLA</i>
<i>Koreň</i>	0,21 \pm 0,002*	0,10 \pm 0,01*	0,43 \pm 0,001
<i>Struk</i>	0,05 \pm 0,001	0,0679 ¹	0,04 \pm 0,001

POZNÁMKA K TABUĽKE 9 ¹ V STRUKU FBZ NEBOLO MÔŽNÉ SPRAVIŤ ARITMETICKÝ PRIEMER A VYHODNOTIŤ ŠPECIFICKÚ AKTIVITU VZHLADOM NA POUŽITELNOSŤ LEN JEDNEJ HODNOTY



OBRÁZOK 20 POROVNANIE AKTIVITY GPX V JEDNOTLIVÝCH VZORKÁCH
 HODNOTY ŠPECIFICKEJ AKTIVITY ENZÝMU SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3
 NEZÁVISLÝCH MERANÍ. SIGNIFIKANTNÁ ZMENA ($p < 0,05$) OPROTI KONTROLNEJ SKUPINE JE OZNAČENÁ
 HVIEZDIČKOU (*)

IVM a FBZ spôsobili zníženie aktivity v koreni rastliny (Obr. 20). V struku nedošlo k signifikantnej zmene aktivity. V listoch ani semenách rastlín sa aktivitu nepodarilo stanoviť.

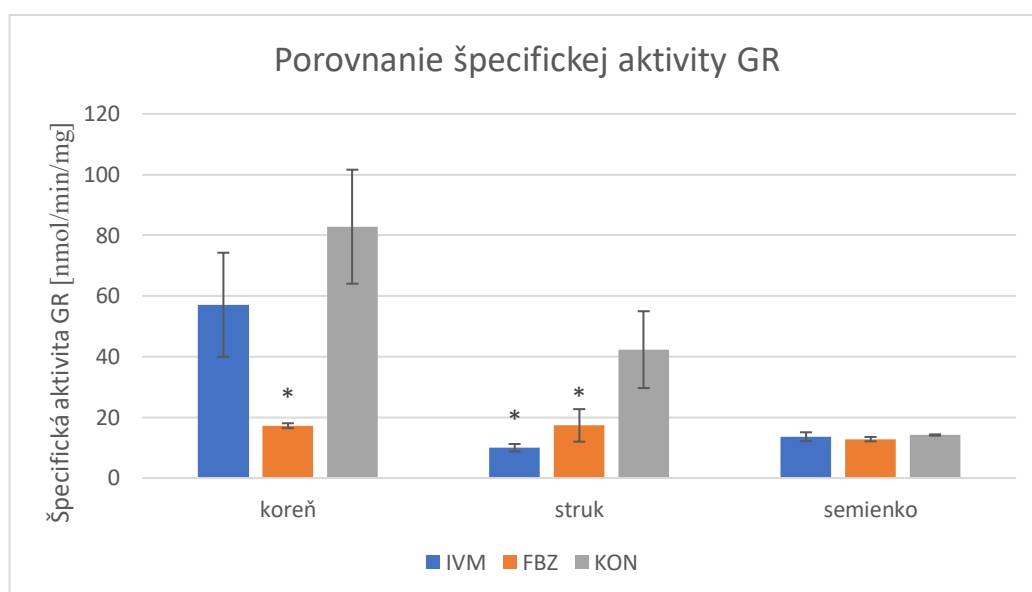
5.2.6. AKTIVITA GLUTATIÓNREDUKTÁZY

Stanovenie aktivity enzýmu GR je založené na sledovaní spotreby NADPH pri premene GSSG na GSH, čo sa prejavuje zmenou absorbancie meranej pri 340 nm. Výsledné priemerné hodnoty špecifickej aktivity z troch meraní sú uvedené v Tabuľke 10 spolu so smerodajnými odchýlkami.

Aktivitu v liste nebolo možné spočítať kvôli nelineárnemu poklesu absorbancie, preto nebola zahrnutá v porovnaní.

TABUĽKA 10 Špecifická aktivita GR v jednotkách nmol/min/mg

	<i>IVERMEKTÍN</i>	<i>FENBENDAZOL</i>	<i>KONTROLA</i>
<i>Koreň</i>	57,10 ± 17,16	17,25 ± 0,81*	82,83 ± 18,79
<i>Struk</i>	9,99 ± 1,22*	17,35 ± 5,36*	42,31 ± 12,66
<i>Semienko</i>	13,63 ± 1,46	12,82 ± 0,72	14,18 ± 0,21



OBRÁZOK 21 POROVNANIE AKTIVITY GR V JEDNOTLIVÝCH VZORKÁCH
HODNOTY ŠPECIFICKEJ AKTIVITY ENZÝMU SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3 NEZÁVISLÝCH MERANÍ. SIGNIFIKANTNÁ ZMENA ($p < 0,05$) OPROTI KONTROLNEJ SKUPINE JE OZNAČENÁ HVIEZDIČKOU (*)

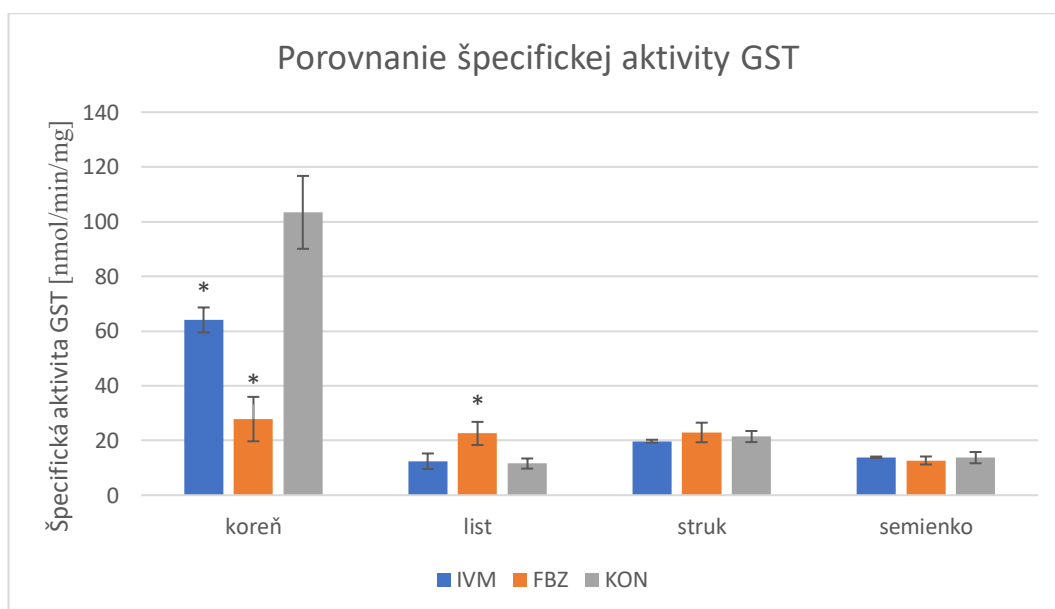
Na Obr. 21 je možné vidieť, že aktivita sa líši v koreni aj v struku, kým u semienka nie. Pri vzorkách z koreňa je možné vidieť, že aktivita GR je výrazne znížená u FBZ. Vo vzorkách struku je aktivita GR znížená pri skupine IVM aj FBZ.

5.2.7. AKTIVITA GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZY

Princíp merania aktivity GST spočíval v tvorbe konjugátu GSH-CDNB. Absorbancia tohto konjugátu bola využitá k výpočtu aktivity enzýmu, ktorá bola ďalej prepočítaná pomocou koncentrácie proteínu na špecifickú aktivitu enzýmu v jednotkách nmol/min/mg. Tabuľka 11 uvádza priemerné hodnoty zo štyroch rôznych meraní.

TABUĽKA 11 Špecifická aktivita GST v jednotkách nmol/min/mg

	<i>IVERMEKTÍN</i>	<i>FENBENDAZOL</i>	<i>KONTROLA</i>
<i>Koreň</i>	64,07 ± 4,56*	27,83 ± 8,12*	103,39 ± 13,32
<i>List</i>	12,44 ± 2,83	22,58 ± 4,23*	11,58 ± 1,85
<i>Struk</i>	19,73 ± 0,55	22,94 ± 3,59	21,45 ± 2,03
<i>Semienko</i>	13,86 ± 0,28	12,69 ± 1,46	13,74 ± 2,06



OBRÁZOK 22 POROVNANIE AKTIVITY GST V JEDNOTLIVÝCH VZORKÁCH
HODNOTY ŠPECIFICKEJ AKTIVITY ENZÝMU SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3 NEZÁVISLÝCH MERANÍ. SIGNIFIKANTNÁ ZMENA ($P < 0,05$) OPROTI KONTROLNEJ SKUPINE JE OZNAČENÁ HVIEZDIČKOU ()*

Podľa Obr. 22 je možné vidieť, že aktivita GST sa odlišuje len pri vzorkách z koreňa a listu. V koreňoch sóje ovplyvnenej anthelmintikami je aktivita GST nižšia oproti kontrolnej skupine. Toto zníženie je zjavné u oboch liečiv FBZ aj IVM, pričom výraznejšie zníženie je v skupine rastliny pestovanej pod vplyvom FBZ. FBZ spôsobil zvýšenie aktivity v liste.

5.3. EXPRESIA ENZÝMOV

5.3.1. HODNOTENIE KONCENTRÁCIE, ČISTOTY RNA A ÚČINNOSTI PRIMEROV

Na vyhodnotenie koncentrácie a čistoty RNA bol použitý spektrofotometer NanoDrop. Nanodrop vyhodnotil jednotlivé koncentrácie RNA z konkrétnych vzoriek a zároveň zhodnotil čistotu RNA podľa pomeru absorbančie A260/A280 (vyjadrujúceho kontamináciu proteínmi a jeho hodnota by mala byť väčšia ako 1,8) a podľa pomeru A260/230 (vyjadrujúceho kontamináciu fenolom, hodnota pomeru by sa mala nachádzať v rozmedzí 1,8–2,2).

Nasledujúca Tabuľka 12 udáva hodnoty koncentrácie jednotlivých vzorkov v jednotkách ng/ μ l.

TABUĽKA 12 Koncentrácie RNA uvedené v jednotkách ng/ μ l

<i>TYP</i>	<i>KOREŇ [ng/μl]</i>	<i>LIST [ng/μl]</i>	<i>STRUK [ng/μl]</i>	<i>SEMIENKO [ng/μl]</i>
<i>Kontrola 1</i>	161,7	133,8	4,5	98,8
<i>Kontrola 2</i>	64,4	173,1	75,1	146,3
<i>Kontrola 3</i>	64,4	73,2	44,2	119,9
<i>Fenbendazol 1</i>	29,8	4,9	22,0	214,3
<i>Fenbendazol 2</i>	45,7	40,7	4,6	25,6
<i>Fenbendazol 3</i>	88,1	216,7	5,1	60,4
<i>Ivermektín 1</i>	36,9	60,8	61,5	107,5
<i>Ivermektín 2</i>	62,8	76,1	85,0	181,3
<i>Ivermektín 3</i>	55,0	51,5	12,8	287,9

Poznámka k Tabuľke 12 :červenou farbou sú zvýraznené hodnoty, ktoré neboli použité k PCR kvôli príliš nízkej koncentrácii RNA vo vzorkách a oranžovou farbou hraničné hodnoty koncentrácie

TABUĽKA 13 Percentuálne vyjadrenie účinnosti primerov

GADPH	ACT3	APX	CAT	FeSOD
94%	105%	87%	94%	92%

Ďalším krokom bolo stanovenie účinnosti primerov pre referenčné aj pre cieľové gény. Primery pre APX, CAT a FeSOD sú primery pre cieľové gény enzýmov. GADPH a ACT3 sú referenčné gény, u ktorých nedochádza vplyvom experimentálnych podmienok ku zmenám stability alebo variability génovej expresie. Často sú to tzv. housekeeping gény, ktoré sú nevyhnutné pre zaistenie základných biochemických procesov a mali by byť stabilné za rôznych podmienok. K týmto génom sa vzťahuje expresia študovaného génu.

V Tabuľke 13 sú uvedené hodnoty účinnosti primerov v percentách. Hodnoty by mali byť v intervale 90-110 %. Všetky primery zo stanovených vyhovujú tomuto rozmedziu.

5.3.2. ANALÝZA EXPRESIE VYBRANÝCH GÉNOV

Na porovnanie expresie jednotlivých enzýmov (APX, CAT, FeSOD) bola použitá relatívna komparatívna metóda, podrobnejšie rozpísaná v kapitole 4.9.3. K výsledným hodnotám kontrolných vzoriek neovplyvnených anthelmintikami (kalibrátor), boli vzťahnuté hodnoty vzoriek ovplyvnených IVM alebo FBZ. Výsledky sú teda vyjadrené ako násobky, ktoré vyjadrujú koľkokrát je hladina génovej expresie nižšia alebo vyššia oproti kontrolnej vzorke.

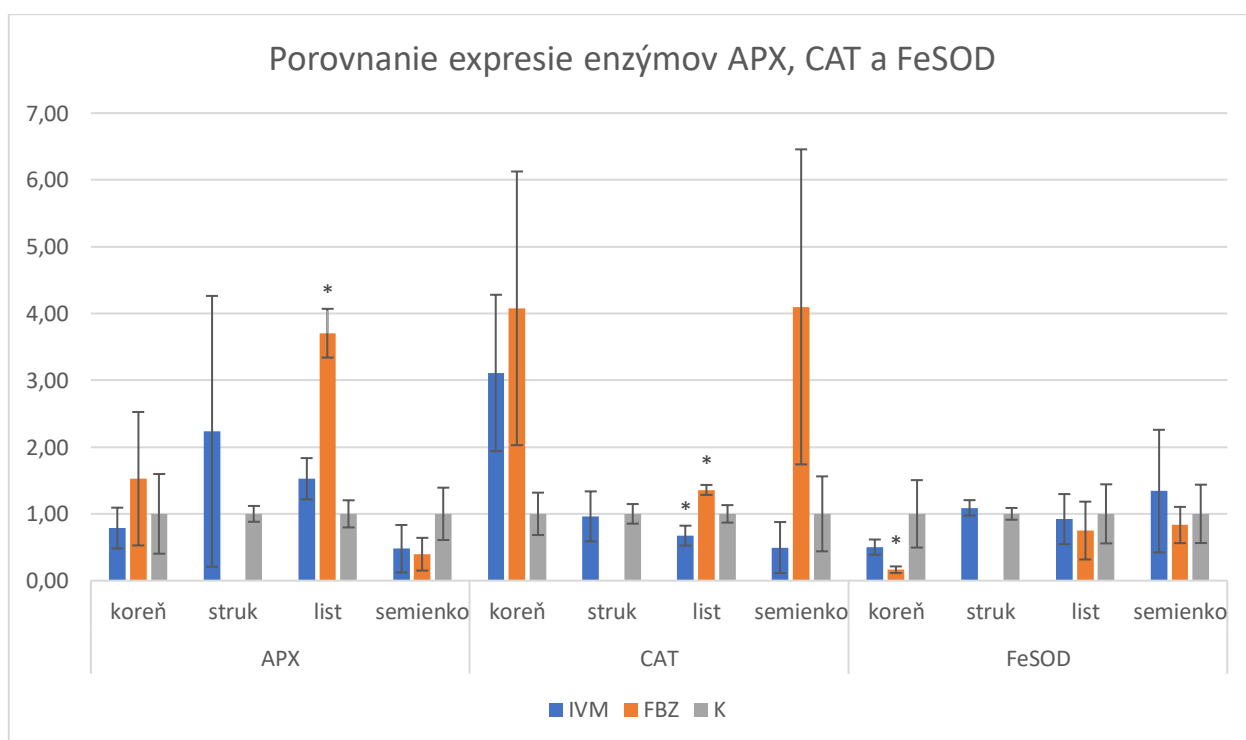
Výsledné aritmetické priemery a smerodajné odchýlky sú uvedené v Tabuľke 14. Uvedená hodnota predstavuje priemer z troch rôznych vzoriek rovnakej časti rastliny a rovnakej skupiny. Porovnanie medzi jednotlivými skupinami zobrazuje Obrázok 23.

V strukoch sóje ovplyvnenej FBZ sa nepodarilo vyhodnotiť expresiu enzýmov z dôvodu nízkej koncentrácie RNA.

TABUĽKA 14 Výsledky stanovenia expresie antioxidantných enzýmov pomocou relatívnej komparatívnej metódy

		<i>KON</i>	<i>FBZ</i>	<i>IVM</i>
APX	<i>koreň</i>	1 ± 0,6	1,53 ± 1,0	0,79 ± 0,31
	<i>struk</i>	1 ± 0,12	n.d.	2,24 ± 2,03
	<i>list</i>	1 ± 0,2	3,71 ± 0,37*	1,53 ± 0,31
	<i>semienko</i>	1 ± 0,39	0,40 ± 0,24	0,48 ± 0,35
CAT	<i>koreň</i>	1 ± 0,32	4,08 ± 2,05	3,11 ± 1,17
	<i>struk</i>	1 ± 0,15	n.d.	0,96 ± 0,37
	<i>list</i>	1 ± 0,13	1,36 ± 0,07*	0,67 ± 0,15*
	<i>semienko</i>	1 ± 0,56	4,10 ± 2,36	0,50 ± 0,38
FeSOD	<i>koreň</i>	1 ± 0,51	0,16 ± 0,05*	0,50 ± 0,11
	<i>struk</i>	1 ± 0,09	n.d.	1,09 ± 0,12
	<i>list</i>	1 ± 0,44	0,75 ± 0,43	0,92 ± 0,38
	<i>semienko</i>	1 ± 0,44	0,83 ± 0,27	1,34 ± 0,92

POZNÁMKA K TABUĽKE 14 N.D. = NEBOLO STANOVENÉ



OBRÁZOK 23 GRAF PREDSTAVUJE POROVNANIE EXPRESIE MEDZI KONTROLNOU SKUPINOU SÓJE A SKUPINOU SÓJE OVPLYVNENOU IVM ALEBO FBZ. HODNOTY SÚ VYJADRENÉ AKO ARITMETICKÉ PRIEMERY Z 3 RASTLÍN. SIGNIFIKANTNÁ ZMENA ($p < 0,05$) OPROTI KONTROLNEJ SKUPINE JE OZNAČENÁ HVIEZDIČKOU (*)

Zhodnotenie expresie APX: Vzhľadom na veľkosť smerodajných odchýlok, k signifikantnej zmene expresie došlo iba v listoch sóji ovplyvnenej FBZ. FBZ spôsobil

nárast expresie oproti kontrolnému vzorku. V strukoch nebolo možné porovnať expresiu, pretože vzorky FBZ neboli použiteľné kvôli nízkej koncentrácii RNA.

Zhodnotenie expresie CAT: Ovplyvnenie expresie je viditeľné v listoch, v skupine FBZ je expresia zvýšená oproti kontrole, kým v skupine IVM naopak je expresia znížená.

Zhodnotenie expresie FeSOD: V porovnaní expresie FeSOD došlo k rozdielu v koreni, kde v skupine ovplyvnenej anthelmintikom FBZ je znížená expresia FeSOD.

6. DISKUSIA

Veterinárne liečivá sú kontaminanty, ktoré sa dostávajú do životného prostredia priamo prostredníctvom ošetrovaných zvierat alebo aj nepriamo hnojením pôdy alebo použitím kontaminovanej vody. Environmentálny dopad a riziko týchto liečiv nie je skúmané tak často ako je to u humánnych liečiv (predovšetkým u antibiotík, steroidných liečiv a hormónov), avšak aj veterinárne liečivá môžu byť prijímané rastlinami a tak predstavovať potenciálne nebezpečenstvo (Jjemba, 2002a).

Keď sa biomasy obsahujúce nemetabolizované alebo čiastočne metabolizované zlúčeniny aplikujú ako pôdne hnojiva, zlúčenina môže byť dostupná k absorpcii rastlinami. Takáto expozícia môže ovplyvniť rast a vývoj týchto rastlín, pričom vplyv závisí najmä od typu látok, dávky, sorpčnej (adsorpčnej a desorpčnej) kinetiky a mobility v pôde. Zatiaľ čo nie je žiadny dôkaz o tom, či bioakumulácia niektorých terapeutických zlúčenín predstavuje významné ohrozenie zdravia pre spotrebiteľov poškodených rastlín, je nepochybné, že niektoré zlúčeniny sú škodlivé pre rast rastlín, ako to dokazujú kontrolované laboratórne pokusy. Štúdie *in vitro* ukazujú, že niekoľko terapeutických látok má nepriaznivé účinky na rastliny (Jjemba, 2002a).

Bioakumulácia terapeutických látok rastlinami bola preukázaná. Taktiež bola prevedená štúdia v ktorej bola sledovaná možnosť vstupu liekov do potravinového reťazca prostredníctvom príjmu z pôdy do potravinárskych rastlín. Výsledky ukazujú, že po aplikácii hnoja s obsahom veterinárnych liekov na pôdu v ekologicky reálnych koncentráciách sú vybrané látky prijímané rastlinami na zistiteľných úrovniach. Táto štúdia sa konkrétne zaoberala výskytom liečiv v koreňoch mrkvy a listoch šalátu. V listoch šalátu bola detegovaná napríklad prítomnosť florfenikolu ($c=15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), levamisolu ($c=170 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a trimetoprimu ($c=6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). V koreni mrkvy bol zistený okrem florfenikolu, trimetoprimu aj enrofloxacín. Tieto hodnoty nepredstavujú riziko pre človeka ako konzumenta (pretože sú nižšie ako akceptovateľné denné príjmy), ale narušili rast a vývoj rastliny (Boxall et al., 2006).

Okrem toho, že liečivá v prostredí predstavujú riziko vzniku rezistencie a možnosť ohrozenia zdravia populácie cez potravinový reťazec, patria k jedným zo stresových faktorov pre rastliny vyvolávajúc stresové podmienky stimulujúce produkciu ROS, ktoré pre rastliny predstavujú nebezpečenstvo oxidačného stresu, poškodenia až úhynu. Rastliny sú však chránené antioxidantným systémom pozostávajúcim z enzýmových

a neenzýmových antioxidantov, ktoré majú schopnosť zachytávať a eliminovať ROS a znižovať ich koncentráciu na fyziologickú hodnotu.

V porovnaní s ostatnými stresovými faktormi (ako je napríklad vplyv nízkych/vysokých teplôt, vlhkosti, nedostatku živín, salinity, ťažkých kovov, ...), štúdií a prác, ktoré by sa zaoberali vplyvom liečiv ako stresových faktorov na antioxidantné enzýmy je omnoho menej, prípadne sú zamerané hlavne na vplyv antibiotík.

Podľa štúdie Stuchlíková et al., (2018) uskutočnenej na *in vitro* regeneratoch rastliny skorocelu kopijovitého (*Plantago lanceolata*), v ktorej bol pozorovaný vplyv FBZ a FLU, je rastlina schopná tieto anthelmintika prijať z prostredia/pôdy a transponovať ich do nadzemných častí rastliny. Taktiež v rastline dochádza k ich metabolizácii a FBZ a FLU spôsobujú oxidačný stres a znižujú antioxidantnú ochranu rastliny. Pozorovaný bol vplyv týchto liečiv na aktivitu enzýmov CAT, APX, SOD, POX, GST. Vplyv anthelmintík IVM a FBZ na aktivitu enzýmov CAT, POX, APX, GR, GST, SOD u suspenzných kultúr rastliny arábkovky thalovej (*Arabidopsis thaliana*) bol sledovaný v rámci diplomovej práce Hanulíkovej, (2018). V oboch týchto prácach bol zaznamenaný vplyv liečiv na aktivitu antioxidantných enzýmov.

Pri porovnaní vplyvu FBZ v oboch rastlinách (*Arabidopsis thaliana*, *Plantago lanceolata*) nebol pozorovaný vplyv na aktivitu APX, kým v sóji však bol zaznamenaný pokles aktivity APX v koreni, struku aj semienkach a zároveň štatisticky významne zvýšená génová expresia APX v listoch. FBZ mierne zvýšil aktivitu APX v listoch. Aktivita ďalších enzýmov sa taktiež odlišuje. Aktivita SOD v koreňoch sóje bola znížená, podobne ako aj u rastliny *Plantago lanceolata*. Naopak u *Arabidopsis thaliana* bol pozorovaný nárast aktivity SOD. Nárast aktivity SOD bol zaznamenaný tiež v listoch *Glycine max* pod vplyvom FBZ. Podobne to bolo aj u aktivity GST, ktorá bola u skorocelu zvýšená (taktiež v listoch sóje pod vplyvom FBZ) a znížená u arábkovky rovnako ako v koreňoch sóje. Rovnaký vplyv je možné pozorovať pri aktivite POX sóje ovplyvnenej FBZ. Zmena aktivity POX sa vyskytla u skorocelu kde bola opäť aktivita znížená, u arábkovky nebola zaznamenaná zmena aktivity po expozícii FBZ.

Rozdiely môžu byť spôsobené medzidruhovou odlišnosťou, dlhodobším vplyvom anthelmintík (u suspenzných kultúr max 72 hodín vs. u rastlín pestovaných v skleníku 45 dní) a pôsobením viacerých vplyvov vzhľadom na pestovanie rastlín v skleníku (prostredie viac odpovedajúce podmienkam pestovania) oproti pestovaniu v sterilných podmienkach na kultivačných médiách.

Vplyv IVM bol analyzovaný v rámci diplomovej práce u suspenzných kultúr arábkovky thalovej. Aktivita SOD, GR a GST bola podobne ako u sóje znížená. Rozdiel je v aktivite POX, ktorá bola u arábkovky signifikantne vyššia, kým u sóje bol zaznamenaný pokles aktivity. Rovnako bol u sóje zaznamenaný inhibičný vplyv na aktivity enzýmu APX a GPX na rozdiel od arábkovky, kde nebola pozorovaná zmena aktivity týchto enzýmov voči kontrolnej skupine rastlín.

Aktivita SOD ako jedného z antioxidantných enzýmov bola signifikantne znížená v koreni pod vplyvom oboch liečiv, výraznejší pokles je zjavný pod vplyvom FBZ. V liste naopak nárast aktivity vplyvom FBZ, u IVM je aktivita taktiež zvýšená ale nie signifikantne. V strukoch a semienkach aktivita nie je liečivami ovplyvnená a je takmer zhodná s aktivitou v kontrolnej skupine. Veľmi podobne ako SOD je aktivita ovplyvnená u enzýmu POX: aktivita v koreni je v oboch prípadoch znížená a opäť je vplyvom FBZ zvýšená aktivita v liste, kým u IVM je takmer rovnaká ako v kontrolnej skupine. IVM však spôsobil pokles aktivity v strukoch. V semienkach nie je žiadny rozdiel aktivity medzi skúmanými skupinami a kontrolou. Podobný vplyv je vidieť u aktivity APX, kde je taktiež výrazne znížená aktivita v koreňoch rastlín kultivovaných s anthelmintikami oproti kontrolnej skupine rastlín. V liste nie je zmena dostatočná aby bola štatisticky významná, ale pri oboch liečivách (viac pri FBZ) je nárast aktivity. V strukoch aj v semienkach je u oboch liečiv štatisticky významný pokles aktivity. Aktivitu enzýmu GPX sa podarilo zhodnotiť len v koreňoch, kde podobne ako u predchádzajúcich enzýmoch bola výrazne nižšia aktivita vplyvom IVM aj FBZ a v strukoch, kde nedošlo k zmene aktivity voči kontrole. Podobné zmeny aktivity boli zaznamenané aj u enzýmu GR. Pokles aktivity sa vyskytol v koreňoch ale tentokrát štatisticky významný rozdiel spôsobený len FBZ. V struku obe liečiva zapríčinili pokles aktivity a aktivita v semienkach bez zmeny. Obe anthelmintiká opäť spôsobili pokles aktivity GST v koreňoch a v liste nárast aktivity vplyvom FBZ. Struky a semienka bez zmeny voči kontrole.

Obecne je možné vidieť, že aktivita bola ovplyvnená liečivami predovšetkým v koreňoch, kde bol zaznamenaný pokles aktivity u všetkých enzýmov vplyvom oboch liečiv (výnimkou je GR kde štatisticky významný pokles len FBZ). Príčinu tendencie k zníženiu aktivity hlavne v koreňoch rastlín kultivovaných s IVM a FBZ, je možné vysvetliť tým, že rastliny boli roztokmi liečiv zalievane a prijímali tieto liečiva z pôdy prostredníctvom koreňov, takže v koreňoch bola pravdepodobne koncentrácia anthelmintík najvyššia.

Ďalším dôvodom môže byť, že niektoré z antioxidantných enzýmov majú rôzne izoformy v rôznych organelách v koreňoch a listoch a tieto rôzne izoformy môžu rozdielne reagovať na prítomnosť anthelmintík.

Najmenej ovplyvnené boli aktivity enzýmov v semienkach a v strukoch. Rozdiel aktivity v semienkach bol nameraný len pri aktivite APX, kde vplyvom oboch liečiv bol zaznamenaný štatisticky významný pokles. V strukoch bola rovnako znížená aktivita APX a navyše tiež znížená aktivita GR vplyvom oboch liečiv a IVM spôsobil pokles aktivity POX.

Zmenou prítomnou vo viacerých prípadoch je nárast aktivity vplyvom FBZ v listoch zaznamenaný u enzýmu SOD, POX a GST, u APX taktiež ale nie dostatočne významný. V prípade GR aktivita v liste nebola stanovená. Pri vplyve IVM bola aktivita u týchto enzýmov nezmenená alebo zvýšená len minimálne - nie dostatočne aby bola štatisticky významná.

Štatisticky významná zmena expresie pozorovaná v troch enzýmoch sa vyskytla v štyroch prípadoch. Spoločný javom je zvýšená expresia v listoch u enzýmu APX a CAT vplyvom FBZ. V prípade APX zvýšená aktivita odpovedá zvýšenej aktivite, ktorá však nebola dostatočne výrazná aby bola štatisticky významná. Keďže aktivitu CAT sa nepodarilo namerať, nie je možné zhodnotiť koreláciu medzi expresiou a aktivitou. V prípade CAT je však aktivita v liste ovplyvnená aj IVM - expresia je však naopak znížená oproti kontrolnej skupine. Vplyv FBZ v koreni na enzým SOD je zhodný, v prípade expresie aj aktivity došlo k poklesu.

Z nameraných dát je zjavné, že anthelmintiká IVM a FBZ majú vplyv na antioxidantné enzýmy *Glycine max* a to na ich aktivitu aj expresiu, čo môže spôsobiť vyššie riziko oxidačného poškodenia rastliny s čím súvisí aj riziko negatívneho ovplyvnenia rastu až úhynu. Podľa výsledkov je možné usúdiť, že vplyv má najmä FBZ, ktorý výraznejšie a vo viacerých prípadoch ovplyvnil aktivitu aj expresiu enzýmov oproti IVM.

S globálnymi klimatickými zmenami a znečisťovaním životného prostredia však existuje zvýšené riziko vystavenia rastlín viac ako jednému stresu v poľných podmienkach. Za prirodzených rastových podmienok sú preto rastliny často vystavené viac ako jednému stresu súčasne alebo postupne (Atkinson & Urwin, 2012). Pre komplexnejšie informácie o vplyve anthelmintík na antioxidantné enzýmy rastlín by bolo vhodné výsledky štúdií overiť na rastlinách vyskytujúcich sa v prirodzených prostrediach ako sú pastviny a hnojené polia, kde dochádza k expozícii rastlín vplyvu anthelmintík.

7. ZÁVER

V tejto diplomovej práci bola prevedená analýza vplyvu anthelmintika IVM a FBZ na aktivitu a expresiu vybraných antioxidantných enzýmov u sóje fazuľovej (*Glycine max*)

- Rastlinné kultúry *Glycine max* boli vypestované a ovplyvnené zvolenými anthelmintikami. K analýze boli využité rastliny pestované v skleníku.
- Zozbieraný rastlinný materiál bol rozdelený na jednotlivé časti: korene, listy, struky a semienka z ktorých boli pripravené subcelulárne frakcie
- Metódou podľa Bradfordovej bola stanovená koncentrácia proteínov v jednotlivých vzorkách. Koncentrácia sa využila k výpočtu špecifickej aktivity enzýmov.
- Aktivita u siedmych antioxidantných enzýmov (CAT, SOD, APX, POX, GPX, GR, GST) bola zmeraná a vyhodnotená, pričom u CAT sa nepodarilo aktivitu namerať.

U oboch skupín rastlín ovplyvnených anthelmintikami IVM a FBZ bol zaznamenaný štatisticky významný pokles aktivity enzýmu SOD (v koreni), POX (v koreni), APX (v koreni, struku a v semienkach), GR (v struku), GPX (v koreni) a GST (v koreni). Pokles aktivity v skupine rastlín ovplyvnených IVM bol zaznamenaný u enzýmu POX (v struku). U rastlín exponovaných FBZ sa zmena aktivity vyskytla pri enzýmoch: SOD, POX a GST kde bol zaznamenaný štatisticky významný nárast aktivity v listoch a u enzýmu GR pokles aktivity v koreni.

- Využitím qRT-PCR bola porovnaná expresia troch enzýmov (FeSOD, APX a CAT) u rastlín ovplyvnených anthelmintikami voči kontrolnej skupine. Vyhodnotením je porovnanie – indukcie/inhibície expresie enzýmov rastlín pestovaných pod vplyvom anthelmintík ku kontrolnej neovplyvnenej skupine.

Štatisticky významná zmena expresie bola zaznamenaná len v štyroch prípadoch. Zvýšená expresia APX v listoch, zvýšená expresia CAT v strukoch a znížená expresia SOD v koreni sa vyskytla u skupiny rastlín pestovaných pod vplyvom FBZ. Signifikantný pokles expresie SOD v koreni skupiny rastlín ovplyvnených FBZ koreluje s poklesom aktivity SOD v koreni, zvýšená expresia APX v listoch odpovedá zvýšenej aktivite, ktorá však nebola štatisticky významná. U rastlín pod vplyvom IVM bola zaznamenaná znížená expresia CAT v liste.

8. ZOZNAM SKRATIEK

ACT3	aktinín alpha 3
APX	askorbátperoxidáza
AsA	kyselina askorbová
AsA-GSH	askorbát-glutatiónový cyklus
BSA	bovinný sérový albumín
CAT	kataláza
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G-250
cDNA	komplementárna DNA
CDNB	1-chlór-2,4-dinitrobenzén
ddH ₂ O	redestilovaná voda (<i>double distilled water</i>)
DDT	dichlórdifenyiltrichlórétán
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNáza	deoxyribonukleáza
dNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
DTT	ditiotreitol
EDTA	kyselina etyléndiaminotetraoctová
ER	estrogenový receptor
EWS	pracovný roztok enzýmov (<i>Enzyme Working Solution</i>)
FBZ	fenbendazol
FLU	flubendazol
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GPX	glutatiónperoxidáza
GR	glutatiónreduktáza
GSH	glutatión
GSSG	oxidovaný glutatión
GST	glutatión-S-transferáza
IVM	ivermektín
NADPH	redukovaný nikotínamidadenínindinukleotidfosfát
PCR	polymerázová reťazová reakcia (<i>PolymeraseChainReaction</i>)
POX	peroxidáza
PVP	polyvynilpyrolidon

RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktívne druhy kyslíka
RT	reverzná transkriptáza
SERM	selektívny modulátor estrogenových receptorov
SOD	superoxiddismutáza
WST	tetrazoliová soľ rozpustná vo vode (<i>water-soluble tetrazolium salt</i>)

9. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377–390.
- Anderson, D., Waters, M. D., & Marrs, T. C. (2001). *Current Toxicology Series Series Editors*.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., ... Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19002–19029.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–3543.
- Bai, S. H., & Ogbourne, S. (2016). Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere*, 154, 204–214.
- Bártíková, H., Podlipná, R., & Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144, 2290–2301.
- Beynon, S. A. (2012). Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 113–124.
- Boxall, A. B. A. (2004). The environmental side effects of medication. *EMBO Reports*, 5(12), 1110–1116.
- Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E. J., & Croxford, A. (2004). *Veterinary Medicines in the Environment* (pp. 1–91). Springer, New York, NY.
- Boxall, A. B. A., Johnson, P., Smith, E. J., Sinclair, C. J., Stutt, E., & Levy, L. S. (2006). Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2288–2297.

- Breton, R., & Boxall, A. (2003). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Regulatory Drivers and Research Needs. *QSAR & Combinatorial Science*, 22(3), 399–409.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). [59] Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484–490.
- CFIA. (2012). The Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean) - Plants - Canadian Food Inspection Agency. Dostupné z: <<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/glycine-max-l-merr-/eng/1330975306785/1330975382668>> [cit. 2019-03-21].
- Charan Tripathy, B., & Oelmüller, R. (2012). Plant Signaling & Behavior Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 1621 *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1621–1633.
- Crump, A., & Ōmura, S. (2011). Ivermectin, “wonder drug” from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 87(2), 13–28.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 156–165.
- Darmanti, S., Dewi, K., & Hartanto Nugroho, L. (2016). *ANTIOXIDATIVE DEFENSES OF SOYBEAN [Glycine max (L.) Merr. cv. Grobogan] AGAINST PURPLE NUTSEDGE (Cyperus rotundus L.) INTERFERENCE DURING DROUGHT STRESS. J. Anim. Plant Sci (Vol. 26).*
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 57(5), 779–795.
- Daughton, C. G. (2007). Chapter 1 Pharmaceuticals in the environment: sources and their management (pp. 1–58).
- De Gara, L., de Pinto, M. C., & Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(10), 863–870.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228.

- Ducháček, L., & Lamka, J. (2008). *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 4. vyd. Praha: Karolinum, 152s. ISBN 9788024627908.
- Ducháček, L., & Lamka, J. (2014). *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 128s. ISBN 9788024627922
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006, February 10). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. Elsevier.
- Floate, K. D., Wardhaugh, K. G., Boxall, A. B. A., & Sherratt, T. N. (2005). FECAL RESIDUES OF VETERINARY PARASITICIDES: Nontarget Effects in the Pasture Environment. *Annual Review of Entomology*, 50(1), 153–179.
- Fox, L. M. (2006). Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(6), 588–593.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 44(1), 147–159.
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247(1), 1–11.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., ... Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10375–10394.
- Góth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2–3), 143–151.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31(4), 261–272.
- Handy, D. E., Lubos, E., Yang, Y., Galbraith, J. D., Kelly, N., Zhang, Y.-Y., ... Loscalzo, J. (2009). Glutathione Peroxidase-1 Regulates Mitochondrial Function to Modulate Redox-dependent Cellular Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 11913–11921.

- Hanulíková, M. (2018). *Vliv anthelmintik na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů u rostlin*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4), 273–300.
- Holden-Dye, L. (2007). Anthelmintic drugs. *WormBook*, 1–13.
- Holden-Dye, L., & Walker, R. J. (2014). Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1–29.
- Horvat, A. J. M., Babić, S., Pavlović, D. M., Ašperger, D., Pelko, S., Kaštelan-Macan, M., ... Mance, A. D. (2012). Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 31, 61–84.
- Jahodář, L. (2011). *FARMAKOBOTANIKA semenné rostliny*. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-2015-2
- Jjemba, P. K. (2002a). 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(1–3), 267–278.
- Jjemba, P. K. (2002b). The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 93(1–3), 267–278.
- Jones, C. G., Daniel Hare, J., & Compton, S. J. (1989). Measuring plant protein with the Bradford assay. *Journal of Chemical Ecology*, 15(3), 979–992.
- Klatte, S., Schaefer, H.-C., & Hempel, M. (2017). Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5, 61–66.
- Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 6(4), 112–115.
- Mannervik, B. (2006). The Isoenzymes of Glutathione Transferase (pp. 357–417). John Wiley & Sons, Ltd.

- McKELLAR, Q. A., & SCOTT, E. W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13(3), 223–247.
- Messina, M. (2016). Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature. *Nutrients*, 8(12).
- Messina, M., & Messina, V. (2000). Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a brief overview. *Journal of Renal Nutrition : The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, 10(2), 63–68.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410.
- Molaei Rad, A., Ghourchian, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Hong, J., & Nazari, K. (2007). Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*, 362(1), 38–43.
- Morley, N. J. (2009). Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(2), 161–175.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts; Its Inactivation in Ascorbate-Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical. *Plant and Cell Physiology*, 28(1), 131–140.
- Ne Vanacker, H., Carver, T. L. W., & Foyer, C. H. (1998). *Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves*.
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–1582.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., & Peč, P. (2005). *Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu*. *Chem. Listy* (Vol. 99).

- Prasse, C., Löffler, D., & Ternes, T. A. (2009). Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic sediment/water system. *Chemosphere*, 77(10), 1321–1325.
- Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., & Pessarakli, M. (2014). Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 37(10), 1573–1585.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012a). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012b). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.
- Shigeto, J., & Tsutsumi, Y. (2016). Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytologist*, 209(4), 1395–1402.
- Singh Gill, S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, K., Ahmad, I., ... Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations.
- Smyth, J. D., & Halton, D. W. (2018). The Physiology of Trematodes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(6), 1285–1285.
- SOD Protocol. (n.d.).
 Dostupné z: <https://www.dojindo.eu.com/Protocol/SOD_Oxidative_Stress.pdf> [cit. 2018-10-08].
- Soumen, B. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst-Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 89, 1113–1121.
- Soy Plant, (n.d.).
 Dostupné z: <<https://www.bilderbeste.com/foto/soy-plant-25.html>> [cit. 2019-04-29].

- Stuchlíková, L. R., Skálová, L., Szotáková, B., Syslová, E., Vokřál, I., Vaněk, T., & Podlipná, R. (2018). Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*, 681–687.
- Wagil, M., Białk-Bielińska, A., Puckowski, A., Wychodnik, K., Maszkowska, J., Mulkiwicz, E., ... Stolte, S. (2015). Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(4), 2566–2573.
- Wang, Y., Wang, Q., Zhao, Y., Han, G., & Zhu, S. (2015). Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress response. *Gene*, *566*(1), 95–108.
- Ye, L., & Zhang, Y. (2001). Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*, *22*(12), 1987–1992.