

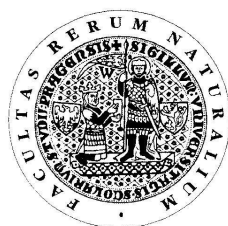
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Bc. Jana Bystroňová

STUDIUM STRESOVÝCH ODPOVĚDÍ ROSTLIN  
NA PŘÍTOMNOST LÉČIV V KULTIVAČNÍM MÉDIU

Study of plant stress responses in presence  
of pharmaceuticals in cultivation medium

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr., Mgr. Petr Soudek, Ph.D.

Praha 2012

Tato práce byla podporovaná projektem Ministerstva školství: KONTAKT LH 11048.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 24.dubna 2012

## ABSTRAKT

Cílem této práce bylo ověření možností degradace ibuprofenu pomocí vybraných rostlinných kultur a stanovení aktivit antioxidantních enzymů (peroxidázy, katalázy, askorbát peroxidázy a glutation-S-transferázy), jakožto markerů oxidativního stresu způsobeného ibuprofenem. K experimentům byly použity *Nicotiana tabaccum* (kultivary La Burley 21, SR 1 a jejich GMO) a *Nicotiana glauca*. Rychlost odstranění ibuprofenu u testovaných tabáků tedy klesala v pořadí: *N. tabaccum* SR1 > *N. tabaccum* Zm-p60-1-T4 > *N. tabaccum* TRI 2T2 > *N. glauca* > *N. tabaccum* TRI 2T1 > *N. tabaccum* cv. La Burley > *N. tabaccum* Zm-p60-1-T5. Jako nejvhodnější se pro odstranění ibuprofenu zdál netransformovaný *N. tabaccum* SR1. Dlouhodobý experiment ukázal, že rostlinný stres se projevuje i po delším čase. Dle celkového srovnání aktivit enzymů v kulturách s přítomností ibuprofenu s kontrolami se jako nejvíce tolerantní k ibuprofenu jevil *N. tabaccum* cv. La Burley 21 a jako nejméně tolerantní *N. glauca*.

*Klíčová slova: fytoremediace, ibuprofen, Nicotiana tabaccum, Nicotiana glauca, HPLC, peroxidáza, kataláza, askorbát peroxidáza, glutation-S-transferáza*

## ABSTRACT

The aim of this study was to verify the possibility of ibuprofen degradation by selected plant cultures and determination of activities of antioxidant enzymes (peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase and glutathione-S-transferase) as markers of oxidative stress caused by ibuprofen. *Nicotiana tabaccum* (cv. La Burley 21, cv. SR 1 and their GMOs) and *Nicotiana glauca* were used as experimental plants. The rate of removal of ibuprofen tested by tobacco was decreasing in the following order: *N. tabaccum* SR1 > *N. tabaccum* Zm-P60-1-T4 > *N. tabaccum* TRI 2T2 > *N. glauca* > *N. tabaccum* TRI 2T1 > *N. tabaccum* cv. La Burley > *N. tabaccum* Zm-P60-1-T5. As the most suitable tobacco for the removal of ibuprofen seemed untransformed *N. tabaccum* SR1. The long-term experiment showed that plant stress is being manifested even after longtime. *N. tabaccum* cv. La Burley 21 seemed to be the most tolerant to ibuprofen in compare with the total enzyme activities in cultures with the presence of ibuprofen and controls. *N. glauca* was the least tolerant cultivar.

*Keywords: phytoremediation, ibuprofen, Nicotiana tabaccum, Nicotiana glauca, HPLC, peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathion-S-transferase*

## **Poděkování**

Chtěla bych především poděkovat svému školiteli RNDr., Mgr. Petru Soudkovi, Ph.D. za jeho námět, odborné konzultace a připomínky k diplomové práci. Dále děkuji Ing. Šárce Petrové, Ph.D., Mgr. Marii Příbylové a dalším pracovníkům Laboratoře rostlinných biotechnologií Ústavu experimentální botaniky AV ČR za cennou zkušenost a pomoc při práci v laboratoři.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
2.1	Fytoremediace.....	10
2.2	Fytoremediační techniky .....	11
2.2.1	Fytodegradace.....	12
2.2.2	Fytoextrakce .....	12
2.2.3	Rhizofiltrace .....	13
2.2.4	Fytovolatilizace.....	13
2.2.5	Fytostabilizace .....	13
2.2.6	Hydraulická kontrola.....	14
2.3	Léčiva jako environmentální polutant.....	15
2.3.1	Léčiva a životní prostředí ČR.....	17
2.3.2	Analytické stanovení léčiv ve vzorcích z ŽP.....	18
2.3.3	Odstranění a omezení šíření léčiv v ŽP.....	18
2.4	Příjem a detoxifikace organických xenobiotik v rostlinách .....	19
2.4.1	Vliv organických xenobiotik na metabolismus rostlin.....	22
2.5	Ibuprofen .....	23
2.5.1	Účinek ibuprofenu a jeho degradace.....	24
2.6	Rostliny rodu <i>Nicotiana</i> .....	25
2.6.1	<i>Nicotiana tabaccum</i> .....	25
2.6.2	<i>Nicotiana glauca</i> .....	26
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>29</b>
4.1	Materiál a metody .....	29
4.1.1	Chemikálie.....	29
4.1.2	Rostlinný materiál .....	30
4.1.3	Kultivace kalusové kultury .....	30
4.1.4	Uspořádání experimentů.....	32
4.1.5	Analýza vzorků na HPLC.....	33
4.1.6	Extrakce rostlinného materiálu .....	34
4.1.7	Stanovení proteinů .....	35
4.1.8	Stanovení aktivity enzymů .....	35

<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>38</b>
5.1	Krátkodobý experiment .....	38
5.2	Dlouhodobý experiment .....	44
5.2.1	Peroxidáza .....	44
5.2.2	Kataláza .....	47
5.2.3	Askorbát peroxidáza.....	50
5.2.4	Glutation-S-transferáza .....	53
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>57</b>

## Seznam zkratek

APOX	askorbát peroxidáza
ATB	antibiotika
BFR	pobromované retardátory hoření
CAT	kataláza
ČOV	čistírna odpadních vod
DDT	dichlordifenyltrichlormethylmethan
GC	plynová chromatografie
GMO	geneticky modifikované organismy
GST	glutathion-S-transferáza
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IC	iontová chromatografie
KČOV	kořenové čistírny odpadních vod
LC	kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NG	<i>Nicotiana glauca</i>
PAH	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
POP	perzistentní organické polutanty
POX	peroxidáza
ROS	aktivní formy kyslíku
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)



# 1 ÚVOD

Léčiva lze primárně definovat jako látky sloužící k předcházení, léčení a zmírnění projevů nemoci. Většině populace však není známo, že se také jedná o antropogenní kontaminanty, které znečišťují životní prostředí řádově desítky let. Po druhé světové válce křivka růstu spotřeby léků, vyvolaná právě touto událostí, neklesla. Naopak můžeme zpozorovat přetrvávající rostoucí trend, který s nejvyšší pravděpodobností bude pokračovat také v budoucnu.

O samotný osud, působení a dopad léčiv na přírodu se lidé začali zajímat až relativně nedávno. Léčiva se tak zařadila mezi „nové“ environmentální polutanty spolu s pobromovanými retardátory hoření (BFR), přípravky osobní hygieny, kosmetikou a detergenty.<sup>1</sup> Polutanty, které nejsou vytvořeny přirozenou cestou, ale člověkem, vážně zasahují do životního prostředí a na jejich odstranění by mělo být vynaloženo více úsilí, než tomu bylo doposud. Existuje řada účinných fyzikálně-chemických metod, kterých lze použít na odstranění těchto látek z přírody. Nevýhodou jejich realizace bývá ekonomická náročnost postupů.

Fytoremediační metody, využívající zelené rostliny a spolu s nimi asociované mikroorganismy v rhizosféře, jsou vhodnou alternativou k odstranění, stabilizaci či k transformaci kontaminantů z přírody.<sup>2</sup> Mezi benefity fytoremediace patří bezkonkurenčně nízké finanční náklady, zlepšení struktury a úrodnosti půdy, estetický přínos pro krajinu nebo i skutečnost, že lze zelené technologie kombinovat s tradičními dekontaminačními procesy. Metoda bývá považována jako konečná pro dočištění kontaminované plochy na požadovanou úroveň.<sup>2</sup>

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fytoremediace

Jedna z definic fytoremediací popisuje tyto metody jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci nebo odstraňování kontaminantů životního prostředí.<sup>3</sup> Jejich aplikací lze snížit kontaminaci pocházející z antropogenní činnosti. Z vodních a půdních ekosystémů či z ovzduší lze tedy odstranit konkrétní kontaminanty jako jsou těžké kovy (kadmium, olovo, chrom, arsen atd.), radionuklidy (uran, tritium, cesium, kobalt a stroncium), exploziva (trinitrotoluen, nitroglycerin atd.), barviva a jejich prekurzory, pesticidy, PCBs, PAHs, farmaka, vůně nebo detergenty.<sup>2</sup>

Remediační techniky uplatňují různé biologické procesy a fyzikální jevy rostlin na podporu dekontaminace v místě sanace. Ve vědeckých člancích se objevují synonyma jako zelená, botanická, vegetativní remediace, nebo agroremediace.<sup>4</sup> V posledních letech se tyto techniky dostávají do popředí, mezi metody ostatní.<sup>5,6</sup> Rostliny disponují schopností adsorpce a absorpce anorganických i organických kontaminantů z půdních a vodních systémů. Adsorpce a metabolická transformace polutantů rostlinami jsou pro fytoremediaci velmi vhodný a potenciálně využitelný způsob dekontaminace zasažených ploch.<sup>7</sup> Některé rostliny mohou vynikat schopností přežít i na chudých a kontaminovaných půdách,<sup>8</sup> je ale nutné, na základě výzkumu vybrat ty druhy, které jsou schopné vytvářet dostatečné množství biomasy, absorbovat kontaminující látky a současně jsou schopné těmto nepříznivým podmínkám čelit.<sup>9</sup> Rostlinná biomasa tak zajišťuje nejen dekontaminaci postižených oblastí, ale stimuluje i aktivitu mikroorganismů v půdě, čímž dále pomáhá degradovat polutanty v blízkosti kořenového systému rostlin.

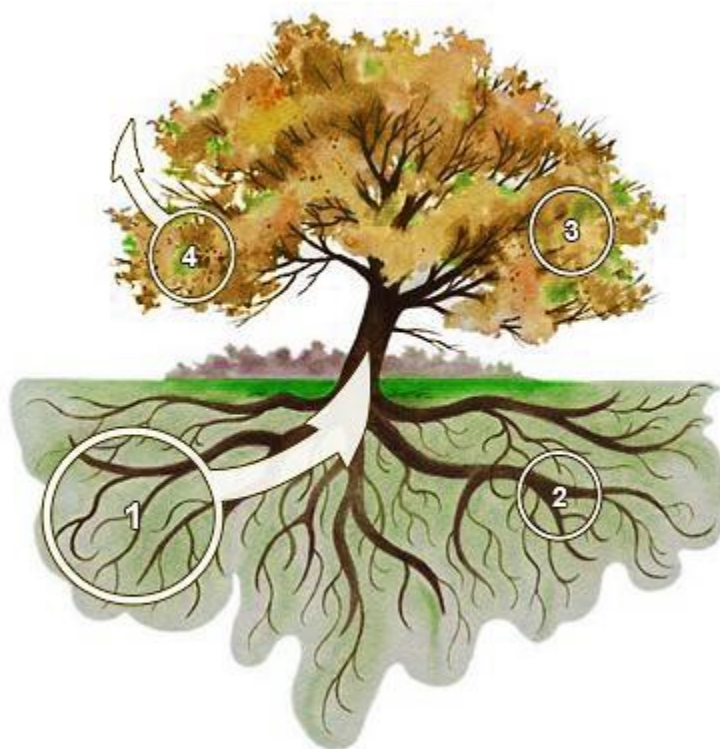
Výzkumy fytoremediačních metod se v posledních letech zaměřují na zvýšení jejich efektivity. Důležitou možností, jak zvýšit efektivitu fytoremediace, je aplikace geneticky modifikované rostlin. Rostlinné geny, které jsou zodpovědné za nadměrnou akumulaci kovů u hyperakumulátorů, jsou vneseny do běžných, rychle rostoucích druhů rostlin. Tento transfer či overexprese genů vede ke zvýšení příjmu kovů, jejich lepší translokaci, uložení nebo mezibuněčnému začlenění. Transgenní druhy mohou být perspektivní cestou, jelikož transgenní rostlina je schopna remediovat vyšší koncentrace kontaminantu za relativně krátký časový úsek.<sup>2</sup> Modelové rostliny *Nicotiana tabaccum* nebo *Arabidopsis thaliana* jsou běžně využívány pro genetické modifikace. Rostliny *Nicotiana tabaccum* s vloženým genem pro tvorbu metallothioneinu jsou schopny overexprese genu pro metallothionein,

což má za následek větší toleranci vůči kadmii. *Arabidopsis thaliana* s vloženým genem pro overexpresi genu pro redukci rtuťnatého iontu je zase schopna tolerovat vyšší koncentrace rtuti než rostliny *A.thaliana* nemodifikované.<sup>6</sup>

## 2.2 Fytoremediační techniky

Komplexně se jedná o kontinuum fytoremediačních procesů, které lze rozdělit podle druhu polutantu, jeho koncentrace, způsobu zpracování rostlinami, rozdílných podmínek a druhu médií či způsobu zacházení s kontaminantem na několik níže detailněji popsaných typů.<sup>4</sup>

Obecně lze říci, že remediační procesy staví zejména na dvou základních strategiích a to na dekontaminaci (fytoextrakce, fytoextrakce, fytoextrakce, rhizofiltrace, rhizodegradace) a stabilizaci (fytoakumulace, hydraulická kontrola).<sup>2,3</sup> Schematické znázornění jednotlivých technik shrnuje Obr. 1.



Obr. 1 Schematické zobrazení fytoremediačních technik - fytoextrakce (1), rhizofiltrace, rhizodegradace, immobilizace (2), fytoakumulace, fytoextrakce (3), fytoextrakce (4).

### 2.2.1 Fytodegradace

Při fytodegradaci rostliny přímo přeměňují kontaminanty a vzniklé produkty zabudovávají do svých buněčných struktur.<sup>5</sup> Metoda nachází využití především pro organické polutanty<sup>10</sup> typu PAHs, PCBs, detergenty, a výbušniny. Z druhů vhodných pro fytodegradaci jsou zkoumané především stromy rodu *Populus*, které je možno geneticky modifikovat tak, aby byly schopny degradovat těžké uhlovodíky, TCE, vinylchlorid, chloroform či benzen.<sup>6</sup> Stromy lze použít i při odstranění ropných uhlovodíků z půdy.<sup>6</sup> Úskalím fytodegradace může být únik toxičtějších metabolitů, než byl samotný polutant před zahájením degradace. Je tedy nezbytné provádět laboratorní experimenty.

### 2.2.2 Fytoextrakce

Principem fytoextrakce je absorpce kontaminantu kořenovým systémem rostliny s následnou akumulací kontaminantu v nadzemní části. Rostliny jsou poté sklizeny a zpracovány termálně nebo chemickou cestou. Tato metoda je vhodná jak pro anorganické, tak pro organické kontaminanty.<sup>5</sup>

Aby metoda dobře fungovala je nutno ji aplikovat na rostlinné druhy s hyperakumulační schopností. Ty rostlinné druhy, které jsou schopny akumulovat kovy ve stokrát vyšší koncentraci než běžné neakumulující rostliny, se nazývají hyperakumulátory (př. *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Crassulaceae*, *Fabaceae*, *Rubiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Chenopodiaceae*, *Sapotaceae*, *Solanaceae*).<sup>2</sup> První definice byla použita pro rostliny obsahující více než 1000 mg niklu v kilogramu sušiny.<sup>11</sup> Proto je třeba s některými sklizenými prvky zacházet jako s odpadem. Metoda s úspěchem nachází využití při sanaci těžkých kovů, polokovů, radionuklidů a nekovů.<sup>2, 12</sup>

Zajímavé využití fytoakumulace přibližuje také fytomining. Jedná se o využití rostlin k získání lukrativních prvků z půdy. Postup fytominingu je takový, že hyperakumulující rostlinné druhy akumulují ve svých pletivech daný prvek (např. indium, kadmium, měď, olovo, stříbro, zinek a jiné)<sup>13</sup>, který se pak získá spálením získané biomasy.<sup>14</sup>

### 2.2.3 Rhizofiltrace

Při odstraňování kontaminantů z povrchových, splaškových nebo vyčerpaných podzemních vod se používá metoda rhizofiltrace. Na rozdíl od fytoakumulace jsou cílovou částí kořeny rostliny. Metoda je finančně výhodná v případě dekontaminace velkých objemů vody s malými koncentracemi polutantů. Z rostlinných druhů se v praxi používají vodní a mokřadní rostliny (orobinec, řasy, parožnatka, apod.)<sup>15</sup> nebo kupříkladu slunečnice (*Helianthus annuus*).<sup>2</sup>

### 2.2.4 Fytovolatilizace

Při příjmu polutantů kořeny rostlin a jejich transportu do nadzemních částí může u některých látek dojít k transpiraci těkavého kontaminantu či jeho produktu do ovzduší. Metodu je vhodné aplikovat při odstranění organických polutantů, ale je vhodná i pro odstranění anorganických prvků, jako je rtuť nebo selen.<sup>4</sup> Z rostlinných druhů jsou schopné fytovolatilizovat mokřadní rostliny, ale také *Brassica juncea* nebo stromy rodu *Populus*.<sup>2</sup>

### 2.2.5 Fytostabilizace

Při fytostabilizaci se kontaminanty v půdě a vodě imobilizují pomocí kořenů rostlin, čímž se sníží jejich transport do podzemní vody a tudíž i potravního řetězce člověka. Kořenový systém prostřednictvím adsorpce, absorpce, komplexace a precipitace eliminuje vymývání kontaminantů z půdy. Svým vzrůstem zabraňuje případné vodní a větrné erozi a tím pádem rozptylu kontaminantu na povrchu. Proto se pro aplikaci používají druhy travnatých rostlin s vláknitými kořeny (např. *Agrostis tennis*, *Festuca rubra*).<sup>4</sup> Současně se zde uplatňuje i vliv produkce huminových látek kořeny rostlin, které váží kontaminant v půdě.<sup>2</sup> Při výběru rostliny vhodné pro fytostabilizaci je také podstatné, aby rostlina netransportovala kontaminant do svých nadzemních částí, a aby se tak kontaminace nešířila dále do potravního řetězce člověka.

## 2.2.6 Hydraulická kontrola

Jedná se o použití vegetace k ovlivnění pohybu podzemních a půdních vod. Rostliny jsou schopny svými kořeny čerpat podzemní vodu, u některých druhů např. dřevin až z hloubky několika metrů. Tato technika může díky rostlinám ovlivnit přesun a potenciálně pojmout velké množství podzemní vody, omezit nebo zabránit pronikání a loužení kontaminantů a vyvolat vzestupný proud vody z hladiny podzemní vody skrze nenasycené zóny.<sup>4</sup> Vysázením některých rychle rostoucích dřevin, např. topolů (*Populus* sp.), jejichž kořenový systém dosahuje hloubky několika metrů, lze tedy regulovat průtok kontaminované podzemní vody půdním sedimentem a minimalizovat tak nebezpečí možné kontaminace vodotečí.<sup>5</sup> V tomto případě jsou důležité chemické analýzy vzorků zeminy a podzemních vod odhadující rychlost a směr migrace kontaminantů.<sup>16</sup> Dle vědeckých odhadů jsou 5 let staré topoly schopny absorbovat 100-200 litrů vody denně.<sup>17</sup> Dobrého výsledku dosahují i některé druhy bavlíků a hybridních topolů při remediaci podzemních vod kontaminovaných pesticidy.<sup>18</sup>

### Výhody fytořediace

V porovnání s klasickými fyzikálně-chemickými metodami mají fytořediace tyto výhody:

- množství kontaminovaného materiálu, který je potřeba likvidovat, je značně nižší (kontaminant se transportuje do rostlin, které lze spálit);
- aplikace *in situ* (kontaminovanou půdu není třeba odvážet na místo dekontaminace);
- využití solární energie (fotosyntéza);
- přesun kontaminantů je rychlejší než u přírodní atenuace;
- vysoká akceptovatelnost z pohledu společnosti;
- dochází ke snížení plynné či vodní emise a prašnosti;
- dekontaminovaná půda zůstává na místě a lze ji dále využít (např. pro energetické nebo technické plodiny).<sup>2,6</sup>

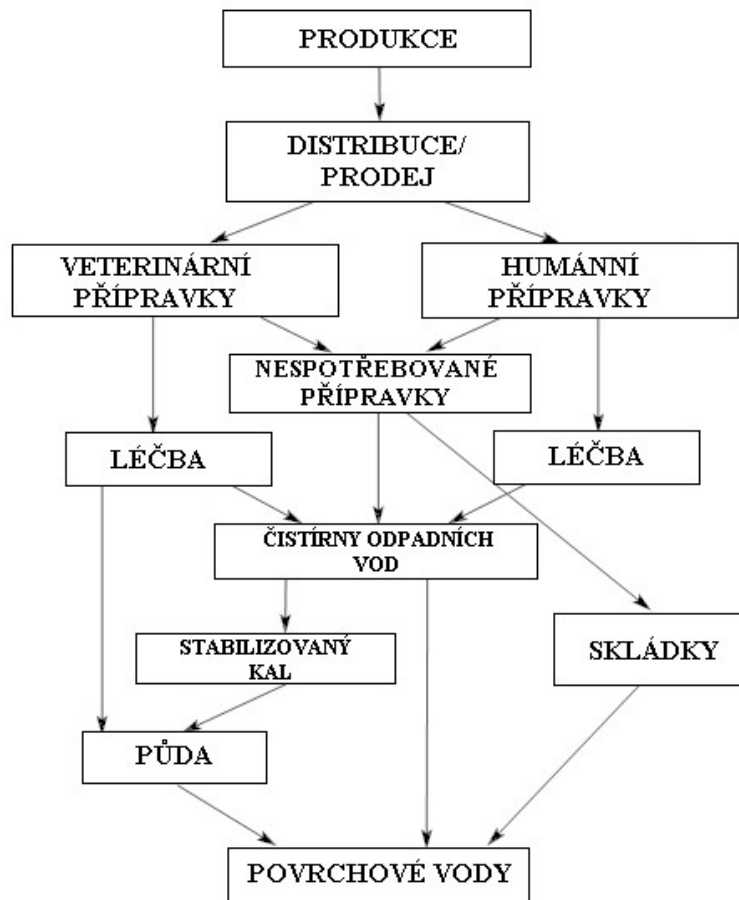
## **Nevýhody fytoremediace**

Na druhou stranu mají tyto metody také nevýhody, jako:

- mnoho sloučenin je ve vysokých koncentracích pro rostliny toxických (nízká tolerance rostlin vůči polutantům);
- nízký transport kontaminantů z kořenového systému do nadzemních částí rostliny;
- druhy schopné remediace mívají malý vzrůst (nízká produkce biomasy);
- obtížná kalkulace nákladů (závisí na lokalitě a kontaminantech);
- rozhodčí orgány nejsou příliš obeznámeni s touto novou technologií;
- potřeba speciálních skládek nebo řízeného spalování pro sklizený kontaminovaný materiál;
- hrozba kontaminace potravního řetězce vlivem spásání zvířete;
- znečištění, které je pod dosahem kořenové zóny, není sanací ovlivněno;
- sanační doba bývá dlouhá (rostliny jsou schopny akumulovat pouze omezené množství kontaminantu);
- biologicky nedostupné formy kontaminantů nejsou rostlinami přijímány;
- v České Republice je absence rostlinných druhů, vhodných pro metodu fytoremediace.<sup>2</sup>

## **2.3 Léčiva jako environmentální polutant**

Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou jednoznačně uživatelé. Ve srovnání s tradičně známými polutanty se distribuce léčiv v základu liší. Schéma toku léčiv a jejich metabolitů je znázorněno na Obr. 2. Aktivní látky, obsažené v léčivech, jsou z těla vylučovány v nezměněné podobě nebo ve formě jejich metabolitů prostřednictvím výkalů a moči, odcházejí obsažené ve splaškách do čistíren odpadních vod. Zde jsou aktivní látky buď zachyceny, nebo přecházejí dále do ekosystému, kde negativně působí na říční biocenózu či se transportují do dalších složek ŽP.<sup>1</sup> Dochází tak dále ke kontaminaci povrchových a podzemních vod, pitných zdrojů, půdy, sedimentů i zemědělské plochy, kde se čistírenské kaly používají jako druhotné hnojivo.



Obr.2 Tok farmak a jejich metabolitů do životního prostředí<sup>1</sup>

Významným zdrojem znečištění jsou též léky s proslou trvanlivostí, které se do koloběhu dostávají ve formě průsaků ze skládek nebo díky spláchnutí do odpadu. Mezi minoritní zdroje patří stabilizovaný kal z ČOV nebo farmaceutická výrobní zařízení.<sup>1</sup>

V komunálních odpadních vodách se léčiva a jejich zbytkové metabolity běžně vyskytují v mikrokonzentracích. Mezi látky, přítomné v již komunálních odpadních vodách, lze zahrnout několik skupin léků, jako jsou antibiotika, antidepresiva, antiflogistika, sympatolytika, antiepileptické léky, cytostatika, psychofarmaka, regulátory tuků, léky snižující hladinu cholesterolu a hormonální antikoncepce.<sup>19</sup> Nebezpečnost aktivních látek vůči ŽP je pak hodnocena podle jejich degradability. Podle odolnosti vůči životnímu prostředí lze tedy léčivé látky rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou látky lehce odbouratelné (např. kyselina acetylsalicylová), druhou látky stálé a hydrofilní (bezafibrát) a třetí látky stálé a lipofilní (ofloxacin). O příslušnosti určité látky k jedné ze skupin rozhoduje souhrn jejich fyzikálně-chemických vlastností, nejvíce rozpustnost,



rozdělovací koeficient 1-oktanol – voda ( $K_{OW}$ ), disociační konstanta ( $pK_a$ ) a Henryho konstanta ( $K_H$ ).<sup>1</sup> Hůře odbouratelná léčiva (především látky patřící do třetí skupiny) se mohou dostat až do potravního řetězce lidské populace.

### 2.3.1 Léčiva a životní prostředí ČR

V současnosti je v České Republice o výskytu léčiv ve vodních ekosystémech a celkově v životním prostředí velmi málo informací. Nicméně ČR náleží převážně horní toky řek a díky tomu je zatížení ŽP léčivy relativně nižší než v ostatních státech EU.<sup>1</sup>

Ze statistických údajů Státního ústavu pro kontrolu léčiv lze zjistit množství léčiv dodávaných do lékáren a jejich výdej. Za předpokladu, že by všechna balení byla zákaznicky spotřebována, lze odvodit roční průměrnou spotřebu léčiv na jednoho občana. K roku 2011 tato hodnota činila přibližně 28,8 balení.<sup>20, 21</sup> V Tab. 1 je uvedeno, která běžně na trhu dostupná farmaka byla v roce 2010 v ČR nejprodávanejší. Je ale velmi těžké odhadnout, do jaké míry jsou posléze tyto přípravky použity a dále, v jaké míře jsou schopny ekosystémy České republiky ovlivnit.

Tab.1: TOP 10 léčivých přípravků dle distribuce v počtech balení za rok 2010<sup>22</sup>

Pořadí	Název skupiny	Počet balení (mil.)
1.	Paracetamol	12,47
2.	Ibuprofen	9,503
3.	Elektrolyty	8,920
4.	Paracetamol, kombinace kromě psycholeptik	5,263
5.	Atorvastatin	3,872
6.	Kyselina acetylsalicylová	3,743
7.	Ramipril	3,705
8.	Metformin	3,368
9.	Omeprazol	3,318
10.	Xylometazolin	3,260

Jako příklad současné kontaminace ŽP léčivy slouží výsledek ze studie prováděné na tocích Vltavy. V řece byla zjištěna přítomnost estrogenů, přičemž nejvyšší koncentrace byla naměřena v blízkosti výtoku ČOV v Uhříněvsi (345 ng.l<sup>-1</sup>).<sup>1</sup>

### 2.3.2 Analytické stanovení léčiv ve vzorcích z ŽP

V současnosti je jen v ČR registrováno přes 1200 různých léčiv, z toho lze v ŽP dobře určit a kvantifikovat kolem 100 z nich.<sup>1</sup>

Analytické stanovení léčiv ve vzorcích odpadních i tekoucích vod komplikuje poměrně složitá matrice. Jako problematická se jeví interakce farmak s huminovými kyselinami a velmi nízké koncentrace samotných xenobiotik (v řádu  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a nižších), vyžadujících předběžnou úpravu vzorků pomocí extrakce na pevné fázi (SPE).<sup>1, 23</sup> Vzorek se tak zakoncentruje a zároveň se zbaví nežádoucích rušivých látek. Pro detekci léčiv se nejčastěji používá v závislosti na charakteru látky kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), či plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS).<sup>1</sup>

### 2.3.3 Odstranění a omezení šíření léčiv v ŽP

O samotném působení účinných látek na lidský organismus získává společnost informace díky klinickým studiím a toxikologickým testům, které jsou legislativně nezbytné. Při posuzování dopadu jednotlivých léčivých přípravků na ŽP však nelze spoléhat jen na informace související s objemem jejich distribuce, neboť tyto údaje nevypovídají o složení a účinnosti konkrétních aktivních látek, jejich degradabilitě a biologické aktivitě. Při hodnocení negativního přínosu léčiv na ŽP je stěžejní ekotoxikologický charakter aktivní látky spolu s jejími metabolickými a degradačními produkty.<sup>1</sup>

Léky jsou vyráběny takovým způsobem, aby reagovaly se specifickými systémy organismu. Díky své specifčnosti se oproti odpadům z průmyslu a agrochemikáliím projevují vysokou biologickou aktivitou. Transformací výchozí látky může biologická aktivita až několikanásobně vzrůst, což se při dekontaminaci polutantu jeví jako značně nevýhodné. Kvůli možným expozičním důsledkům je zvýšená pozornost směřována zejména k antibiotikům a perorálním hormonálním kontraceptivům.<sup>1</sup> Z hlediska ochrany životního prostředí jsou nejvíce nebezpečné látky stálé a látky lipofilní.<sup>1</sup> Inhibice expanze jejich výskytu v životním prostředí tedy není zcela snadný úkon.

S nápravou a pozastavením expanze je rozumné začít u ČOV. Problémem současných klasických komunálních ČOV je ovšem nedostatečná primární konstrukce neuzpůsobená

k odstraňování léčiv z odpadních vod. Základní metody, zahrnující koagulaci a flokulaci, jsou k odstranění organického znečištění naprosto nedostačující.<sup>1</sup> Hlavní metodou vhodnou k odstranění organického znečištění z vod je sorpce na aktivovaný kal, který vzniká v aerobním biologickém stupni ČOV. Problém ale nastává v tom, že tyto kaly mohou být dále využívány v zemědělství, takže xenobiotika z vod se mohou vrátit zpět do ŽP. Ve Švýcarsku je dokonce legislativně zakázáno používání čistírenských kalů jako hnojiv pro zemědělské plochy.<sup>24</sup> V ČR se použití kalů na zemědělských půdách řídí vyhláškou 382/2001 Sb.,<sup>25</sup> kde jsou uvedeny maximální přípustné koncentrace sledovaných látek (těžké kovy, AOX, PCB) v kalech. Bohužel další polutanty sledovány nejsou.

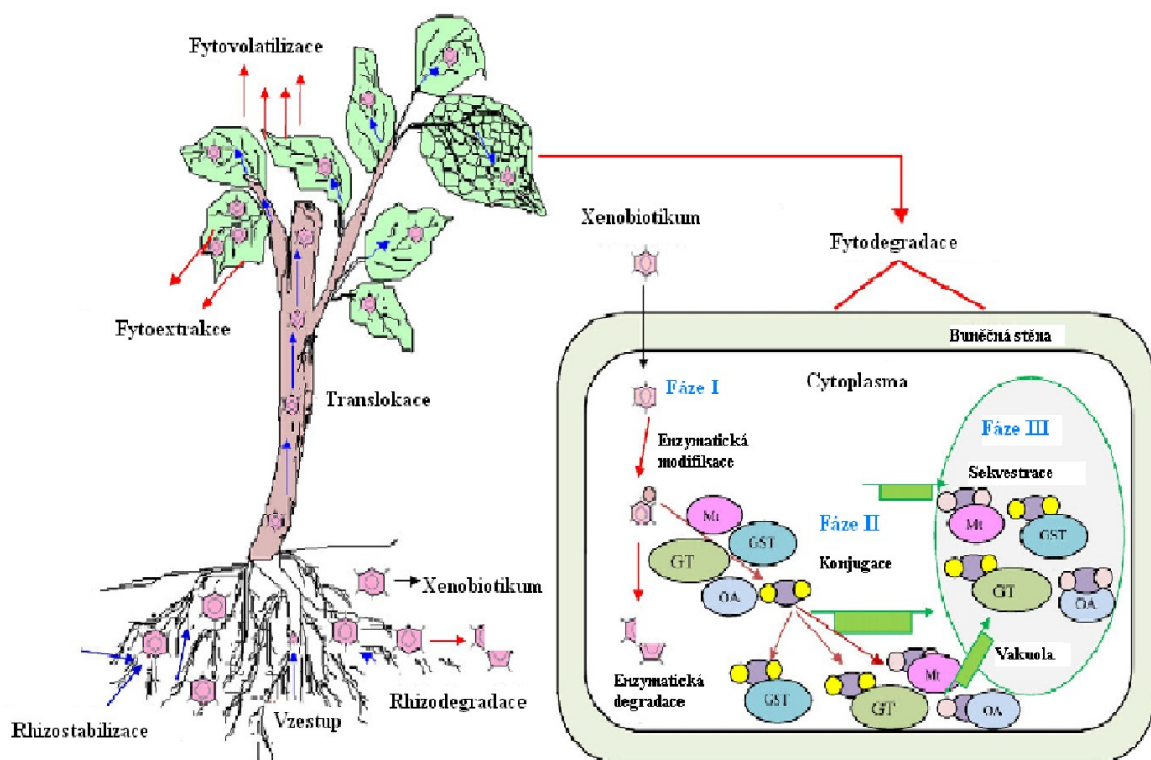
Alternativou ke klasickým ČOV by mohly být kořenové čistírny, které působí na principu již zmiňované rhizofiltrace, kdy dochází k precipitaci kontaminantu nebo absorpci přímo v kořenech.<sup>2</sup> Kořenové čistírny odpadních vod již dnes prokazují vynikající výsledky co se týče problematiky odstranění organického znečištění a nerozpustných látek.<sup>26</sup> Například schopnost degradace antibiotik ve vysokých koncentracích byla prokázána u vodních rostlin *Azolla filiculoides*<sup>27</sup>, *Myriophyllum aquaticum* a *Pistia stratiotes*.<sup>28</sup> Tyto moderní technologické postupy jednoznačně vykazují nejnižší finanční náklady v případech, kdy byly velké objemy vody znečištěny nízkými koncentracemi farmak.<sup>1</sup>

V eliminaci šíření „nových“ environmentálních polutantů životním prostředím by mohly hrát roli také další výše definované fyto-remediační metody<sup>2</sup>, např. fytodegradace, rhizodegradace nebo fytovolatilizace.

## 2.4 Příjem a detoxifikace organických xenobiotik v rostlinách

Xenobiotikum může být stabilizováno nebo degradováno přímo v rhizosféře, adsorbováno nebo kumulováno v kořenech či transportováno do nadzemních částí rostliny, kde může být dále degradováno a uloženo uvnitř rostlinných tkání nebo volatilizováno.<sup>5,6</sup> Příjem a degradační mechanismus xenobiotik pomocí rostlinných systémů detailněji popisuje Obr. 3. Rhizosféra je zóna bohatá na mikroorganismy, které jsou v přímém kontaktu s kořenovým systémem rostlin. Rostliny na kontaminovaných lokalitách mohou pomocí sekrece organických kyselin výrazně ovlivnit redoxní podmínky půdy,

obsah organických látek a půdní vlhkost a tím i druhovou rozmanitost mikroorganismů, které mohou degradovat organické kontaminanty obsažené v půdě.<sup>6</sup> Samotný příjem organických xenobiotik probíhá přímou absorpcí kořeny (z půdy) či listy (z atmosféry) s následným transportem, detoxifikací a zabudováním produktů, vzniklých při detoxifikaci, do rostlinných pletiv.



Obr. 3 Mechanismus příjmu a přeměny xenobiotik v rostlině. Fytodegradace xenobiotik zahrnuje 3 fáze, kdy fáze I. a II. probíhají v cytoplasmě, fáze III. ve vakuole buňky. Aktivní transportéry uplatňující se v II. a III. fázi jsou označeny v zelených boxech (GST = glutathion S-transferázy, GT = glukosyltransferázy, Mt = malonyltransferázy, OA = organické kyseliny).<sup>6</sup>

Základ detoxifikace v rostlinách pak spočívá v přeměně polutantu na látku pro rostlinu pokud možno netoxickou. Rostlina vzniklý produkt uloží do rostlinných kompartmentů, přičemž eliminuje jeho potencionální toxicitu. Metabolismus xenobiotik v rostlinách lze přirovnat k metabolickým degradačním pochodům v játrech savců. Dle typů reakcí a katalyzujících enzymů lze metabolismus rozdělit na tři níže popsané fáze:<sup>29, 30, 31</sup>

### ***I. Transformace (enzymatická modifikace)***

Detoxifikace organických xenobiotik začíná v mitochondriích a v endoplazmatickém retikulu. Zde dochází k oxidaci, redukci nebo hydrolýze cizorodých látek. Během první fáze procesu odbourávání se do xenobiotik začleňují skupiny hydrofilní povahy, například skupina hydroxylová –OH, karboxylová –COOH nebo thio–SH a amino skupina –NH<sub>2</sub>. Díky těmto skupinám se xenobiotikum stává polárnější a je možné jej konjugovat. Pomocí katalytického účinku cytochromů P-450 monooxygenasy (cytP450s)<sup>32, 33</sup> či karboxylesterasy jsou poté vysoce lipofilní sloučeniny transformovány a detoxifikovány. Uvedené skupiny enzymů jsou tedy účastníky dealkylačních, demethylačních, hydroxylačních, dehalogenačních, deaminačních a epoxidačních reakcí. Nejdůležitější rostlinné enzymy s katalytickým účinkem, hrající roli v transformaci organických xenobiotik, jsou vyjmenovány v Tab. 2.

*Tab. 2: Rostlinné enzymy podílející se na transformaci organických látek<sup>34</sup>*

<b>Skupina enzymů</b>	<b>Xenobiotický substrát</b>	<b>Přirozený substrát</b>
cytochrom P – 450	4-chlor-N-methylanilin	kyselina skořicová
Glutathiontransferázy	fluordifen, atrazin, alachlor	kyselina skořicová
Karboxylesterázy	diethylhexylftalát	lipidy, acetylcholin
O-glukosyltransferázy	chlorované fenoly	flavonoidy, koniferylalkohol
O-malonyltransferázy	β-D-glukosidy pentachlorfenolu a 4-hydroxy-2,5-dichlorfenoxy- octové kyseliny	β-D-glukosidy flavonoidů a iso flavonoidů
N-glukosyltransferázy	chlorované aniliny a metribuzin	kyselina nikotinová
N-malonyltransferázy	chlorované aniliny	1-aminocyklopropyl karboxylová kyselina, D- aminokyseliny

### ***II. Konjugace***

Konjugační reakcí kontaminantu s glutathionem, glukosou či s aminokyselinami se zvýší hydrofilita a sníží mobilita xenobiotik.

Enzymy, řadící se do skupiny glykosyltransferasy, mají v této fázi katalytické účinky a připojují sacharid převážně přes – NH<sub>2</sub> nebo – OH skupinu xenobiotik. Další enzymy podílející se na konjugaci jsou glutathion S-transferázy. Tyto enzymy se vyznačují širokou substrátovou specifitou a katalyzují konjugaci xenobiotik s tripeptidem glutathionu přes jeho thiolovou skupinu v cysteinu.<sup>35</sup>

Další typické konjugace II. fáze metabolismu degradace xenobiotik v rostlinách jsou konjugace cizorodé látky s kyselinou malonovou nebo s nerozpustnými konjugáty. Ty jsou poté vázány na složky buněčné stěny jako např. celulózu, lignin či pektiny.<sup>36</sup>

### ***III. Kompartimentace (sekvestrace)***

Vzhledem k tomu, že rostliny nevlastní vylučovací aparát, ukládají cizorodé látky do vakuol nebo buněčných stěn.<sup>37</sup> Konjugace s glutathionem probíhá v cytosolu, ale výsledný konjugát je ukládán ve vakuole,<sup>38</sup> nebo je začleněn do biopolymerů, jako je lignin či celulóza. Pro transport konjugátu z cytosolu do místa uložení rostlina využívá transmembránové proteiny, tzv. ABC transportéry („ATP-binding cassette“), které vynikají schopností přenášet látky přes membránu vakuol za spotřeby ATP.<sup>39</sup>

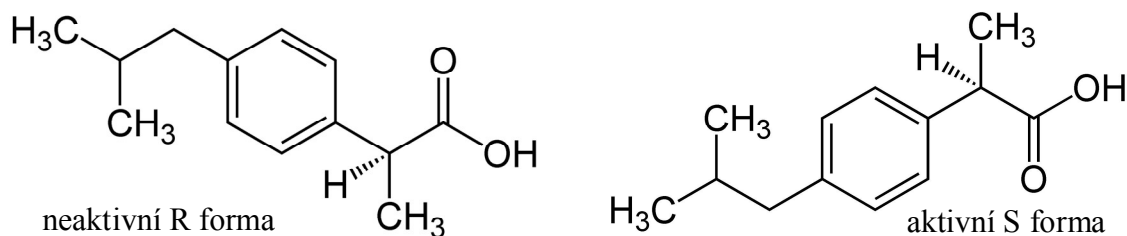
## **2.4.1 Vliv organických xenobiotik na metabolismus rostlin**

Léčiva jsou pro rostliny cizorodé látky, které navíc mohou být pro rostlinu toxické. Taková organická látka je v rostlinném aparátu degradována tak, aby se stala pokud možno netoxickou a dále využitelnou (viz. kapitola 2.4). Může se ale stát, že degradační produkt je také toxický a rostlina je tak vystavena stresu abiotické povahy. Působení stresových faktorů může vyvolat u rostlin oxidativní stres, který je charakteristický tvorbou velkého množství aktivních forem kyslíku (ROS).<sup>40</sup> Zdrojem toxických vedlejších produktů metabolismu je řada redoxních reakcí v mitochondriích nebo fotolýza vody chloroplastovým elektronovým transportním řetězcem.<sup>41</sup> Přítomnost singletového kyslíku následně stimuluje vznik peroxidu vodíku, superoxidového nebo hydroxylového radikálu.<sup>42</sup> Tyto další reaktivní formy kyslíku, zejména hydroxylový radikál, působí destruktivně na lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. Ochranu před oxidačním poškozením organismu vlivem ROS zajišťují antioxidantní obranné systémy, které jsou lokalizovány v buněčných

strukturách. Tyto obranné mechanismy zahrnují neenzymové a enzymové systémy. Velmi účinnými antioxidanty jsou askorbát,  $\beta$ -karoten, redukovaný glutation a  $\alpha$ -tokoferol. Specializované enzymy, mezi něž řadíme superoxiddismutasu, peroxidasu, katalasu a enzymy askorbát-glutathionového cyklu, zabezpečují univerzální obranu rostlin, tzn. chrání rostlinu před abiotickými i biotickým stresem.<sup>43</sup>

## 2.5 Ibuprofen

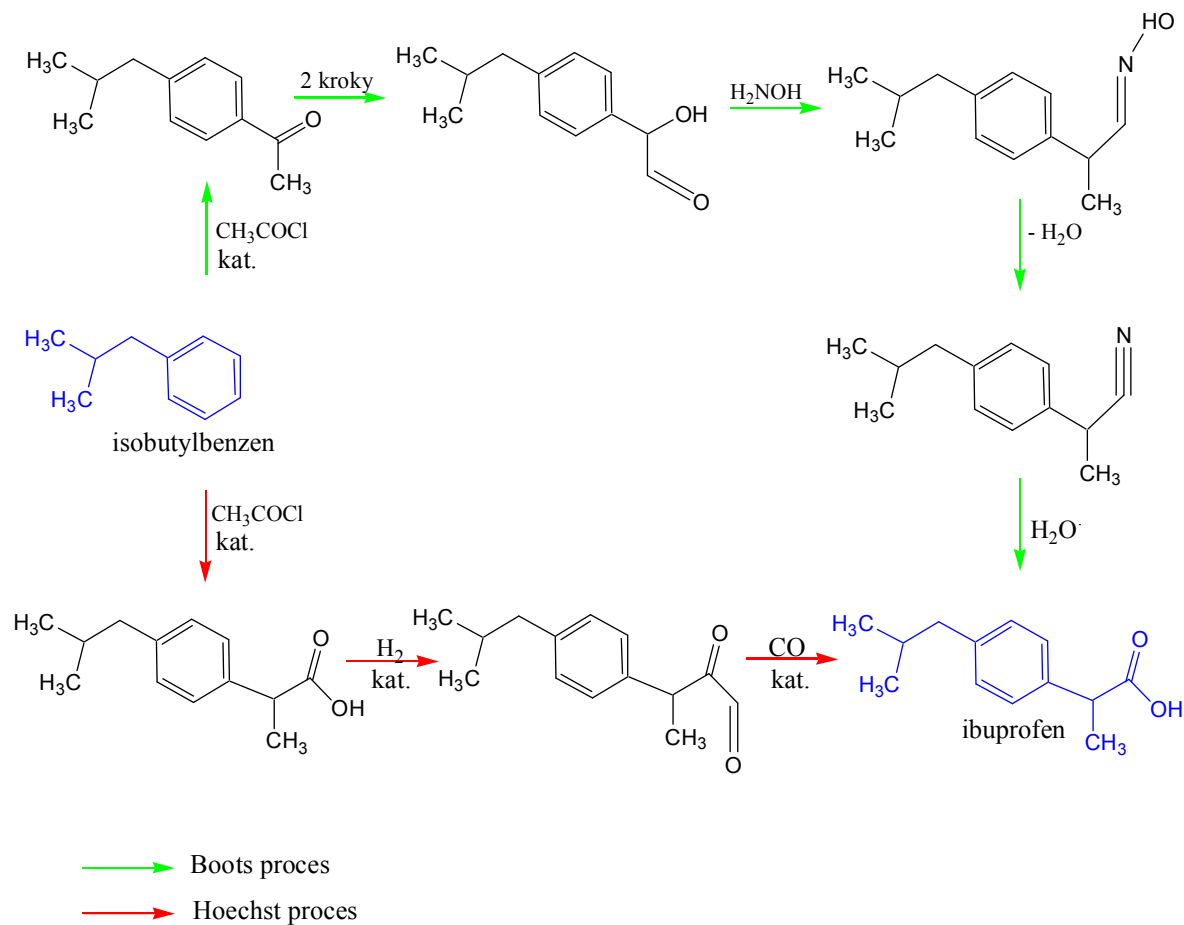
Léčivo ibuprofen patří mezi nejpůvodnější a nejužívanějších u nás i ve světě. Farmakum patří do skupiny analgetik a antiflogistik, takže najde využití při bolestech různého původu, zvýšené teplotě či při zánětech. Účinná látka, se systematickým názvem kyselina 2-(4-isobutylfenyl) propionová se strukturální vzorcem uvedeným na Obr. 4, se vyskytuje jako bílý krystalický prášek nebo jako bezbarvé krystaly. V prodeji je pod komerčními názvy Apo-Ibuprofen, Brufen, Dolgit, Ibalgin, Ibumax, Nurofen aj. Samotná účinná látka je téměř nerozpustná ve vodě, snadno se ale rozpouští v acetonu, etheru, methanolu a dichlormethanu. Lze ji také rozpustit ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů.<sup>44</sup>



Obr. 4 Strukturální vzorce enantiomerů kyseliny 2-(4-isobutylfenyl) propionové

Z historického hlediska byl ibuprofen poprvé uveden na trh v roce 1964 britskou firmou Boots Pure Drug Company. Skutečnost nízké toxicity s minimálními účinky na gastrointestinální trakt dostala lék do popředí oblíbených analgetik a dnes patří mezi nejpoužívanější.<sup>45</sup> Docenění si tento derivát kyseliny propionové zasloužil také pro relativně rychlý nástup účinků, kdy vrchol plazmatických koncentrací nastává za jednu až dvě hodiny. Tato účinná látka snadno prochází placentární bariérou a dostává se poté do synoviální tekutiny, kde zůstává i po poklesu plazmatických hladin.<sup>46</sup>

Příprava ibuprofenu probíhá dvěma způsoby. Obr. 5 popisuje současně postupy firem Boots a Hoechst, kdy prvně uvedený je starší, delší a komerčnější. Jednodušším a novějším, procesem syntézy s katalýzou, je proces firmy Hoechst. V případě obou syntéz je výchozí látkou isobutylbenzen s užitím Friedel-Craftovy acylace. Ibuprofen se syntetizuje a podává jako racemát, avšak lidské tělo dokáže až se 100% účinností přeměnit neaktivní (R) formu stereoisomeru na aktivní (S).<sup>47</sup>



Obr. 5 Příprava ibuprofenu podle postupů firem Boots a Hoechst<sup>47</sup>

## 2.5.1 Účinek ibuprofenu a jeho degradace

Mechanismus účinku ibuprofenu spočívá v inhibici aktivity enzymu cyklooxygenázy. Jedná se o esenciální enzym, který tvoří prostaglandiny lokalizované na endoplazmatickém retikulu buňky, čímž zvyšují citlivost periferních zakončení nocieptorů na chemické mediátory bolesti a podílejí se také na zánětlivé reakci. Molekula enzymu obsahuje aktivní



místo, kde se může navázat kyselina arachidonová a zde dojde k její přeměně na aktivní látku. Po aplikaci léku se místo kyseliny arachidonové naváže právě ibuprofen. Protizánětlivý účinek spočívá v inhibici syntézy leukotrienů spolu s některými funkcemi neutrofilů a lymfocytů.<sup>48</sup>

Z těla odchází 1 až 8% nesteroidního protizánětlivého léku v nezměněné formě, dalších 14% je vylučováno ve formě derivátů kyseliny glukuronové. Ibuprofen nalezený v čistírnách odpadních vod tedy představuje jednu z nejvýznamnějších farmaceutických nečistot. Přestože během průchodu odpadními vodami dojde k jeho 90ti% ztrátám, je množství ibuprofenu běžně měřitelné i ve vzorcích říčních vod.<sup>49</sup> Ztráta je dána degradací ibuprofenu vlivem působení světelného záření.<sup>50</sup> Laboratorní experimenty v zahraničí ukázaly, že se ibuprofen jeví jako snadno degradovatelný.<sup>51</sup> Ve vzorcích vod z životního prostředí a čistíren odpadních vod byly jako hlavní metabolity ibuprofenu identifikovány dvě látky – hydroxy-ibuprofen a karboxy-ibuprofen.<sup>52,53</sup> I přesto, že se ibuprofen vyskytuje ve vodách v koncentraci do 5 µg/l,<sup>54</sup> působí na některé vodní organismy toxicky.<sup>55</sup> Z toho důvodu je třeba dále studovat mechanismy, které pomohou zamezit šíření tohoto polutantu.

## 2.6 Rostliny rodu *Nicotiana*

Rod *Nicotiana* zahrnuje asi 65 rostlinných druhů, rostoucích v subtropické Americe, Austrálii a Tichomoří, které patří k základním surovinám tabákového průmyslu.

Rostliny tohoto druhu produkují jedovatý alkaloid nikotin, který se skládá z pyridinu a N-methylpyrolidinových kruhů. Nikotin je syntetizován primárně v kořenovém systému<sup>56</sup>, přičemž obchodní tabákové kultivary obsahují v sušině 2 až 5% nikotinu. Jeho množství v rostlinných buňkách je ovlivněno dusíkovou fertilizací, rostlinnou dekapitací, vodním režimem nebo axilárním pupenem.<sup>57</sup>

### 2.6.1 *Nicotiana tabaccum*

Tabák virginský (Obr. 6) z čeledi *Solanaceae* je jednoletá, v tropech i víceletá, žláznatě chlupatá bylina původem z Jižní Ameriky. Do Evropy byl druh importován

v první polovině 16. století, v ČR je pěstován od konce 17. století. Rostlina zplaňuje jen vzácně a navíc pouze přechodně. Lodyha je přímá, 80 až 300cm vysoká, málo větvená a na bázi může dřevnatět. Listy jsou přisedlé, pouze dolní krátce řapíkaté, až 60 cm dlouhé, tvarem vejčité až kopinaté. Květy rostou v koncových květenstvích, koruna dlouze nálevkovitá, korunní trubka barevně buď nazelenalá, bílá nebo nažloutlá, korunní lem pěticípý, často růžově až červeně zbarven. Rostlina kvete v letních měsících a jejím plodem je poté tobolka. *Nicotiana tabaccum* vznikla spontánním zkřížením *Nicotiana sylvestris* a *Nicotiana tomentosa*.<sup>58</sup>



Obr. 6 *Nicotiana tabaccum*<sup>59</sup>

### 2.6.2 *Nicotiana glauca*

Celým systematickým názvem *Nicotiana glauca* Graham (Obr. 7) je keř či až strom s měkkou dřevinou, životní strategií stále zelené trvalky a kvetoucí po celý rok. Lodyha je vzpřímená, řídce větvená, obvykle dorůstá 4 m, ale jsou zaznamenány i 8 m dlouhé exempláře.<sup>60</sup>

Rostlina příležitostně syntetizuje jedovatý nikotin jako obranu proti herbivorům<sup>61</sup> k běžně produkovanému anabasinu (pyridinový alkaloid), který je vysoce toxický pro býložravce a lidskou populaci.<sup>62</sup> *Nicotiana glauca* původem z oblastí Jižní Ameriky se někdy pěstuje jako okrasná rostlina<sup>63</sup> a údajně byla používána jako insekticid právě kvůli již zmíněnému alkaloidu anabasinu, který je velmi účinný proti mšicím.<sup>64</sup> V Severní

Americe se nachází na vlhkých, pustinných místech, krajnicích cest, v zemědělských oblastech, podél potoků, v mělčinách, bahně, a na suchých kanalizacích.<sup>65</sup> *Nicotiana glauca* je mrazuvzdorná až do  $-5^{\circ}\text{C}$ .<sup>66</sup> Jedná se o velmi odolný druh, přizpůsobivý k vodnímu deficitu se schopností kolonizovat do okrajových půd. Velkých produkcí nadzemní biomasy dosahuje i v chudých půdách a suchém podnebí.<sup>67</sup>



Obr.7 *Nicotiana glauca* Graham<sup>60</sup>

### **3 CÍLE PRÁCE**

- Ověření možnosti degradace ibuprofenu pomocí vybraných rostlinných kultur.
- Stanovení aktivit antioxidantních enzymů, jakožto markerů oxidativního stresu způsobeného ibuprofenem.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a metody

#### 4.1.1 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> p.a.	Penta
1,2-Dichloro-4-nitrobenzen (DCNB)	Sigma-Aldrich
1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	Sigma-Aldrich
2-(4-isobutylfenyl) propionová kyselina	Sigma-Aldrich
2,4-dichlorophenoxyoctová kyselina	Sigma-Aldrich
4-Nitrobenzoyl chlorid (pNBoC)	Fluka
4-Nitrobenzyl chlorid (pNBC)	Sigma-Aldrich
Agar p.a.	Kulich farma
Askorbát sodný p.a.	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O p.a.	Penta
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O p.a.	Penta
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O p.a.	Penta
Diammonium-2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6) sulfonová kyselina (ABTS)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol p.a.	Sigma-Aldrich
Ethanol p.a.	Penta
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p.a.	Penta
Fluorodifen p.a.	Fluka
Glutathion (GSH) ≥ 98%	Sigma-Aldrich
Guajakol	Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Penta
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> p.a.	Penta
HCl 37%	Penta
CH <sub>3</sub> COOH	Penta
CH <sub>3</sub> OH ≥ 99,8%	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> p.a.	Penta
KI p.a.	Penta
Kinetin	Sigma-Aldrich
KNO <sub>3</sub> p.a.	Penta
Komplexon III (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O) p.a.	Penta
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p.a.	Penta

Chemikálie	Výrobce
MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O p.a.	Penta
Myo-inositol p.a.	Fluka
Na <sub>2</sub> EDTA p.a.	Penta
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O p.a.	Penta
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> p.a.	Penta
Nonidet P40	Roche
Polyvinyl Pyrolidon K30	Carl Roth
Sacharóza p.a.	Penta
Savo Original (5% roztok NaClO)	Bochemie Group
TRIS 99.9% p.a.	Carl Roth
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p.a.	Penta

#### 4.1.2 Rostlinný materiál

Experimenty byly prováděny na suspenzních kulturách *Nicotiana tabaccum* (kultivar SR1 a La Burley 21) a jejich odvozených GMO jak je uvedeno níže v Tab. 3, a na *Nicotiana glauca*. Na Obr. 8 je fotografie vyklíčených semen *Nicotiana glauca* a *Nicotiana tabaccum* cv. SR1.

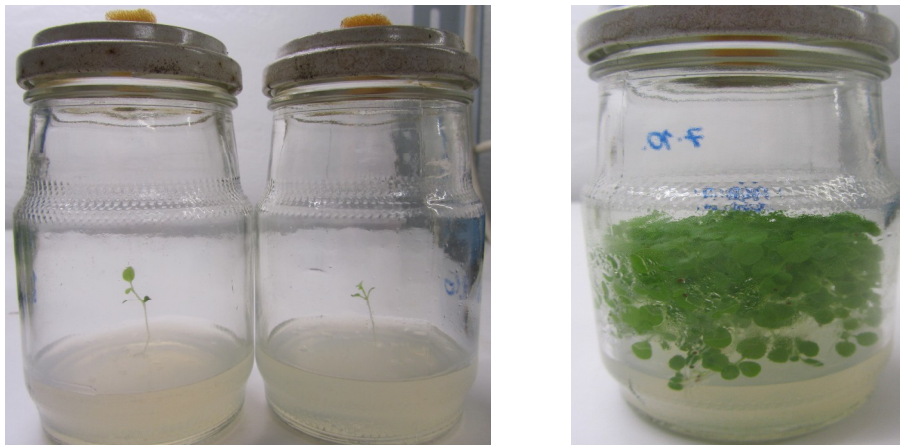
Tab. 3 Kultivary s příslušnými GMO

Kultivar	GMO <sup>68, 69, 70</sup>
SR1	Zm-p60-1-T4
	Zm-p60-1-T5
La Burley 21	TRI 2-T1
	TRI 2-T2

#### 4.1.3 Kultivace kalusové kultury

Nejprve byla semena po dobu asi 2 minut ponechána v 1 ml roztoku 70% etanolu a poté byla sterilizována v 10% roztoku přípravku SAVO po dobu 10 minut. Semena byla poté důkladně třikrát promyta ve sterilní vodě a vložena na pevné kultivační médium označené -H (Tab.4).

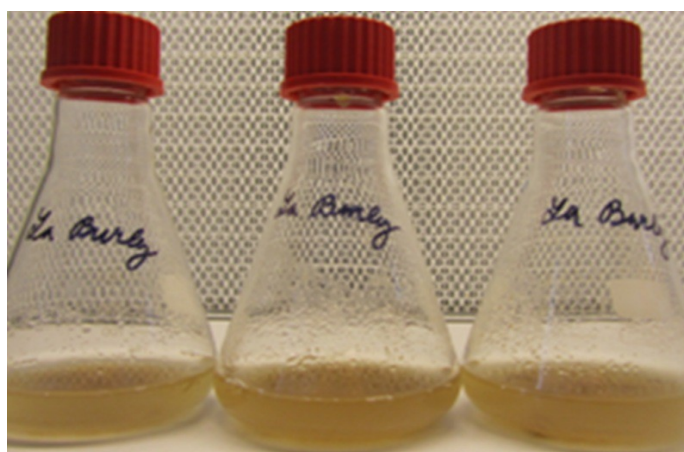
Z vyklíčených semen (Obr. 8) byly odebrány listy, které byly umístěny na pevné kultivační médium s obsahem růstových hormonů a bylo označeno 2+K (Tab. 4). Vzniklý kalus byl následně přesazen do tekutého kultivačního média s obsahem hormonů.



Obr. 8 *In vitro* rostliny kultivarů *Nicotiana glauca* (vlevo) a *Nicotiana tabaccum* SRI (vpravo).

Suspenní kalusové kultury tabáku a jeho GMO byly pěstovány a uchovávány v 250 ml Erlenmayerových baňkách s 50ml tekutého kultivačního média s hormony označeného 2+K (Tab. 4). Na Obr. 9 je fotografie kalusové kultury kultivaru *Nicotiana tabaccum* cv. LaBurley 21.

Všechna kultivační média spolu s veškerým používaným laboratorním sklem byla před zahájením pěstování kultivarů vždy zklávována v autoklávu Vario 75T při tlaku 120kPa a teplotě 120°C po dobu 20 minut. Práce s kulturami (přesazování, výměna média, vlastní experimenty) byla prováděna ve Flow-boxu Holten Lamin Air s horizontálním laminárním prouděním (nominální průtok vzduchu 1506 m<sup>3</sup>/h, pokles tlaku 140 Pa).



Obr. 9 Kalusová kultura kultivaru *Nicotiana tabaccum* cv. LaBurley 21

Tab. 4 – Složení kultivačních médií (pH=5,7) <sup>71</sup>

zásobní roztok	Složky	konc. média v mg/dm <sup>-3</sup>	objem zás.r. v ml/dm <sup>-3</sup> média	typ kultivačního média		
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650	20	pevné kultivační médium "-H"	pevné kultivační médium "2+K"	tekuté kultivační médium "2+K"
B	KNO <sub>3</sub>	1 900	20			
C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	5			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170				
	KI	0,83				
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25				
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025				
D	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	5			
E	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	5			
	MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	24				
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6				
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025				
F	Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	10			
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8				
G	Thiamin	0,4	5			
H	Inositol	0,0001				
I	Sacharóza	30 000				
J	Agar	8 000				
K	Kinetin	0,21	5			
L	2,4-dichlorophenoxyoctová kys.	0,225	5			

Erlenmayerovy baňky s kalusovými kulturami byly uchovávány ve tmě v kultivační místnosti o teplotě cca 25°C na třepače (110 otáček/min, výrobce Vitrum).

#### 4.1.4 Uspořádání experimentů

##### *Krátkodobý experiment*

V případě rostlinných kultivarů *Nicotiana tabaccum* cv. SR1 a cv. La Burley 21, jejichž GMO (Zm-p60-1-T4, Zm-p60-1-T5, TRI 2-T1, TRI 2-T2) a *Nicotiana glauca* probíhal krátkodobý experiment s přidavkem ibuprofenu do kultivačního média.



Den před začátkem experimentu bylo do Erlenmayerových baněk odváženo 10 g suspenzní kultury a přidáno 50 ml tekutého média s hormonem (2+K). Baňky byly poté umístěny zpět do tmy na třepačky v kultivační místnosti. Experiment začal přidáním ibuprofenu do Erlenmayerových baněk s kulturami tabáku (koncentrace ibuprofenu v médiu byla 0,2 mM). Pro každý odběrový čas byly kultivovány paralelně tři rostliny od každého druhu. Vzorky médií byly odebírány po 1, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 hodinách. Médium bylo uchováno v ependorfkách o objemu 1 ml v -80°C až do doby vlastní analýzy koncentrace ibuprofenu na HPLC.

### ***Dlouhodobý experiment***

Jednou z možností, jak získat informace o rostlinném stresu vlivem působení léčiv, je měření aktivit rostlinných enzymů ovlivněných antioxidačním stresem.

Kultivar *Nicotiana tabaccum* cv. La Burley 21, jeho GMO (Zm-p60-1-T4, TRI 2-T2) a *Nicotiana glauca* byly vystaveny působení ibuprofenu. Při této variantě experimentu byl v první den experimentu do baněk s tabákovými kulturami přidán ibuprofen (koncentrace ibuprofenu v médiu byla 0,2 mM) a zároveň proveden sběr kultury s přídavkem i bez přídavku tohoto léčiva pro stanovení aktivit enzymů na počátku experimentu (čas 0). Pro každý odběrový čas byly kultivovány paralelně tři rostliny od každého druhu. Vzorky buněk s přídavkem léčiva i bez přídavku byly posléze odebírány po 1, 2, 4 a 8 dnech. Při sběru docházelo k filtraci buněk přes Büchnerovu nálevku a kultury byly zamrazeny na teplotu -80°C. Zmražené buňky byly takto připraveny na extrakci předcházející vlastnímu stanovení enzymových aktivit.

### **4.1.5 Analýza vzorků na HPLC**

Pro stanovení sledovaného léčiva, tj. ibuprofenu v médiu suspenzních kultur byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), s detektorem DVW-10 Variable Wavelength UV-VIS a kolonou C18 BIOSPHER PSI 100 7µm temperovanou na 35°C. Mobilní fáze pro HPLC byla složena z fáze A (ultračistá voda s 0,25% kyseliny octové) a B (methanol s přídavkem 0,25% kyseliny octové) s gradientem definovaným v Tab. 5. Průtok mobilní fáze byl 1ml/min. Léčivo bylo detekováno při vlnové délce

224nm. Pro kalibraci byly stanoveny hmotnostní koncentrace standardů ibuprofenu v rozmezí 0,1 – 1,2 mg/ml.

*Tab. 5 Procentuální zastoupení gradientů mobilní fáze*

	<b>t (min)</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
fáze	A	40%	0%	0%	40%
	B	60%	100%	100%	60%

#### **4.1.6 Extrakce rostlinného materiálu**

Zmražený vzorek suspenzní kultury (cca 3 g) byl rozetřen tloučkem v třecí misce v prostředí kapalného dusíku a výsledný prášek přesně zvážen v kádince. Dále byl ke vzorku přidán extrakční pufr, kdy množství extrakčního pufru bylo rovno desetinásobku navážky vzorku. Extrakční pufr byl složen ze 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1% PVP K30, 5 mM DTE a 1% Nonidetu P 40.

Směs byla míchána 30 minut magnetickou míchačkou v lázni z ledové tříště. Poté došlo k centrifugaci (centrifuga Universal 32R, Schoeller) na dobu 30-ti minut při 4°C a 4000 otáčkách za minutu ve falkonkách o objemu 50 ml. Dále následovala filtrace vzorku přes Miracloth Filter (výrobce CALBIOCHEM) a vzniklý pelet byl vyhozen. Objem zfiltrovaného supernatantu byl změřen, a znova přelit do kádinky a postaven na míchačku s ledovou tříští. Následovala precipitace vzorku síranem amonným, kdy byl do roztoku přidán síran amonný v množství, které odpovídalo navážce 0,2254 násobku objemu samotného supernatantu. Nově vzniklá směs byla míchána po dobu 30-ti minut na ledové lázni, potom podrobena centrifugaci při 4°C a 11000 otáčkách za minutu (centrifuga Universal 320R, Schoeller) a filtrace přes Miracloth Filter a pelet opět vyhozen. Po změření objemu supernatantu byl opět přidán síran amonný v množství 0,258 násobku objemu supernatantu. Následovalo opět míchání směsi po dobu 30-ti minut a centrifugování při 4°C a 11000 otáčkách za minutu také 30 minut. Po této poslední centrifugaci následovala dekantace centrifugovaného vzorku. V koncové části extrakce byl použit získaný pelet, který byl odsolen pomocí PD 10 kolony (výrobce GE Healthcare). Pelet byl rozpuštěn v 2,5 ml 25mM Tris/HCl-pufu o pH 7,8 a roztok převeden pipetou do kolony PD 10. Následovala eluce proteinů pomocí 3,5 ml pufru do 10 ml falkonky.

Vzorky byly zamrazeny v ependorfkách po 0,5 ml v tekutém dusíku a uskladněny v mrazicím boxu (-80°C). Kolony bylo po každém odsolování nutno propláchnout pomocí 10 ml 0,1 M roztoku HCl a 20 ml destilované vody.

#### **4.1.7 Stanovení proteinů**

Jednalo se o spektrofotometrické stanovení proteinů podle Bradforda<sup>72</sup>, kdy při barevné změně docházelo ke změně hodnoty absorbance. Modré barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250 se v kyselém prostředí vázalo na stanovovaný protein a změnilo barvu na červenou. Stanovení probíhalo při vlnové délce 595 nm na mikrodestičkách umístěných do spektrofotometru TECAN Infinite N200. Koncentrace kalibračních roztoků (Bovine serum albumin) byly následující: 0, 50, 125, 250, 750, 1000, 1500 a 2000 µg/ml. Pro analýzu bylo odpipetováno 10 µl vzorku a 250 µl Bradfordova činidla. Z kalibrační křivky byl poté vypočítán obsah proteinů ve vzorku.

#### **4.1.8 Stanovení aktivity enzymů**

Aktivita enzymů byla měřena pomocí spektrofotometru TECAN Infinite N200 na mikrodestičkách. Sledovaným parametrem byla změna absorbance v závislosti na čase při 25°C. Stanovovány byly následující enzymy: peroxidáza (guajakol), kataláza, askorbát peroxidáza, glutation-S-transferáza (CDNB substrát). Složení roztoků a substrátů je pro jednotlivé enzymy uvedeno v Tab 6.

Tab. 6.: Složení roztoků pufr–substrát pro jednotlivé stanovované enzymy

Enzym	Substrát	Reagencie	Koncentrace pufru [mM]	Pipetovaný objem na směs pufr-substrát	Směs pufr-substrát (do jamky)	Extrakt enzymů (do jamky)
POX <sup>73</sup>	Guajakol	Tris/HCl (pH=6,0)	50	27 ml	190 µl	10 µl
		Guajakol	3,4	600 µl		
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9	600 µl		
CAT <sup>74</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH=7,0)	100	30 ml	140 µl	10 µl
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200	12 ml		
APOX <sup>75</sup>	Askorbát sodný	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH=7,0)	55,56	36 ml	180 µl	20 µl
		Askorbát sodný	60	10 µl		
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	98	41 µl		
GST <sup>76</sup>	CDNB	Tris/HCl (pH=7,5)	100	23,7 ml	150 µl	10 µl
		GSH		500 µl		
		CDNB	0,0122 g/2ml etanolu	1000 µl		

Aktivita enzymů byla následně vypočítána podle rovnice:

$$\text{Aktivita enzymů} = \frac{\left( \frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{vzorku}}} - \frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{blank}}} \right) \cdot V_{\text{celk.}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{enzym}}}$$

$\frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{vzorku}}}$  změna absorbance na změně času vzorku

$\frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{blank}}}$  změna absorbance na změně času slepého stanovení

$V_{\text{celk.}}$  celkové objem v kyvetě

$V_{enzym}$	objem odpipetovaného vzorku
$\varepsilon$	extinkční koeficient
$d$	šířka absorbující vrstvy

Veličiny potřebné na výpočet aktivity enzymů viz Tab. 7. V soustavě SI je jednotkou enzymové aktivity katal (1 kat = 1 mol/s). Výsledné hodnoty aktivity enzymů jsou vztaheny na obsah proteinů a jsou tedy uvedeny v jednotkách kat/mg proteinu.

*Tab. 7.: Veličiny potřebné na výpočet aktivity enzymů*

<b>Stanovovaný enzym</b>	<b>Substrát</b>	<b>Extinkční koeficient [mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>Šířka absorbující vrstvy [mm]</b>	<b><math>V_{celk.}/V_{enzym}</math></b>	<b>Vlnová délka [nm]</b>
POX	Guajakol	26,6	5,94	20	420
CAT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,036	4,63	15	240
APX	Askorbát sodný	2,8	5,94	10	290
GST	CDNB	9,6	5,68	4,75	340

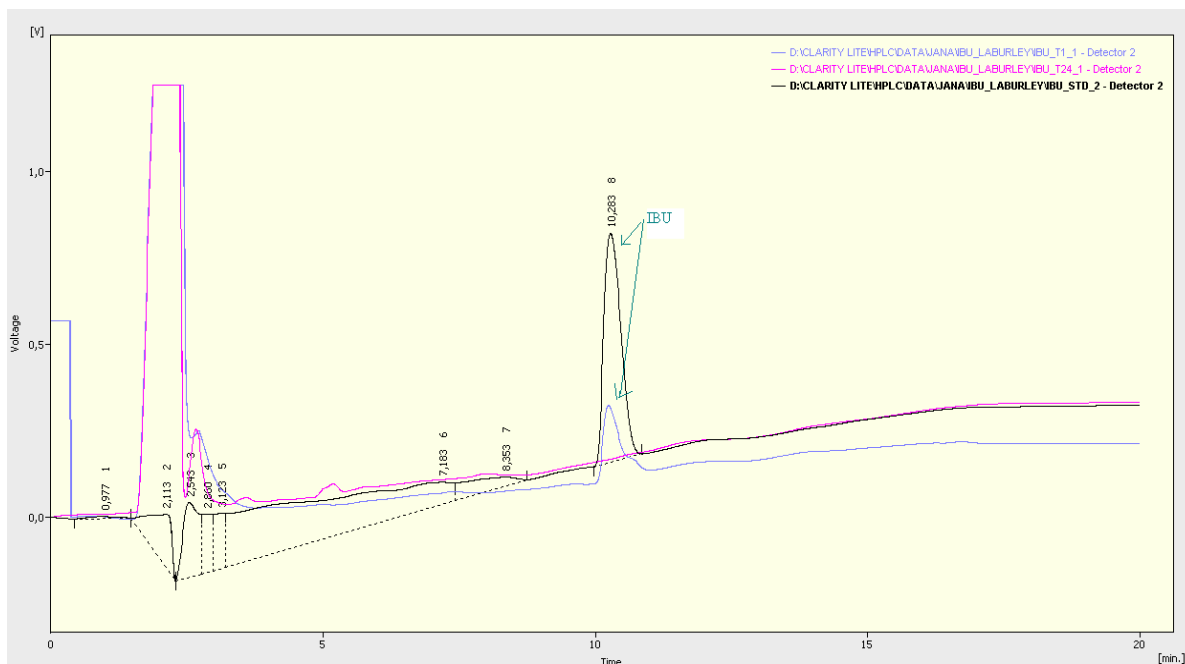
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Krátkodobý experiment

V krátkodobém experimentu byla ověřována možnost degradace ibuprofenu pomocí suspenzních kultur rostlin *Nicotiana tabaccum* cv. SR1 a cv. La Burley 21, jejich GMO (Zm-p60-1-T4, Zm-p60-1-T5, TRI 2-T1, TRI 2-T2) a *Nicotiana glauca*. Kultury rostly v médiu s ibuprofenem o koncentraci 0,2 mM. Degradace ibuprofenu byla zjišťována v médiu po 1, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 hodinách.

Pomocí standardu byl v chromatogramu na základě retenčních časů identifikován ibuprofen. Retenční čas píku pro ibuprofen byl na chromatogramu zaznamenán v desáté minutě separace, viz Obr.10, který názorně ukazuje průběh měření ibuprofenu ve standardu a současně ve dvou vzorcích médií odebraných po 1. hodině a 24 hodinách (T1 a T24). Je zřejmé, že v médiu po první hodině experimentu byl ibuprofen měřitelný, po 24 hodinách již nikoliv. Z chromatogramu tedy vyplývá, že stanovované léčivo bylo již zcela degradováno či se dostalo do cytosolu buňky rostlinné kultury a bylo následně akumulováno ve vakuole.

Degradaci ibuprofenu přímo v médiu s obsahem kultur naznačoval výskyt zdvojeného píku v desáté minutě separace. Jednalo se zřejmě o metabolity ibuprofenu: hydroxy-ibuprofen a karboxy-ibuprofen. Zdvojený pík byl v chromatogramu viditelný i u vzorků odebraných po šesté hodině experimentu. Je ale také možné, že kultury mohly být během experimentu nevědomě zkontaminovány a tyto izomery vznikaly mikrobiální aktivitou.

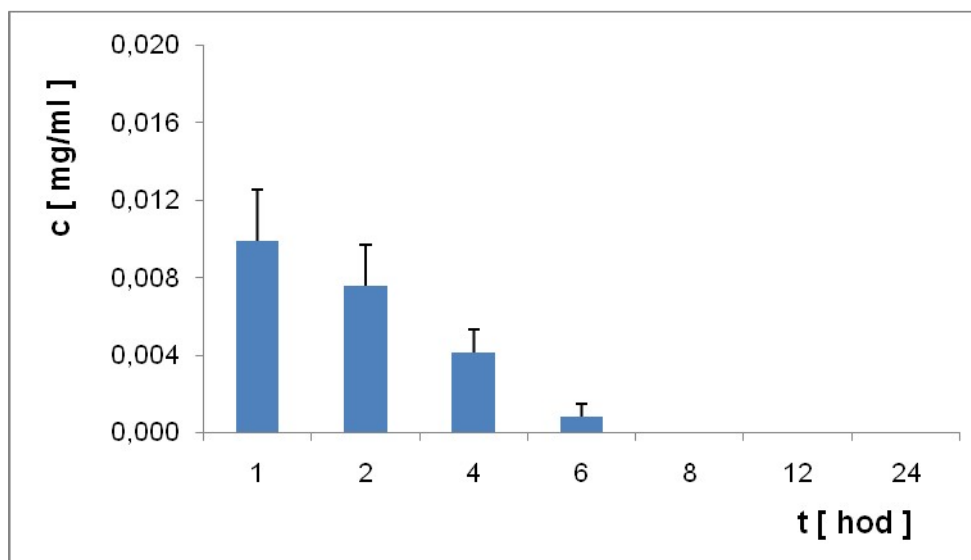


Obr 10.: Detekce ibuprofenu - standard o koncentraci 0,8 mg/ml (černá); médium od kultury *N. tabaccum* cv. La Burley 21 odebraný po 1 hodině (modrá); médium od kultury *N. tabaccum* cv. La Burley 21 odebraný po 24 hodinách (ružová).

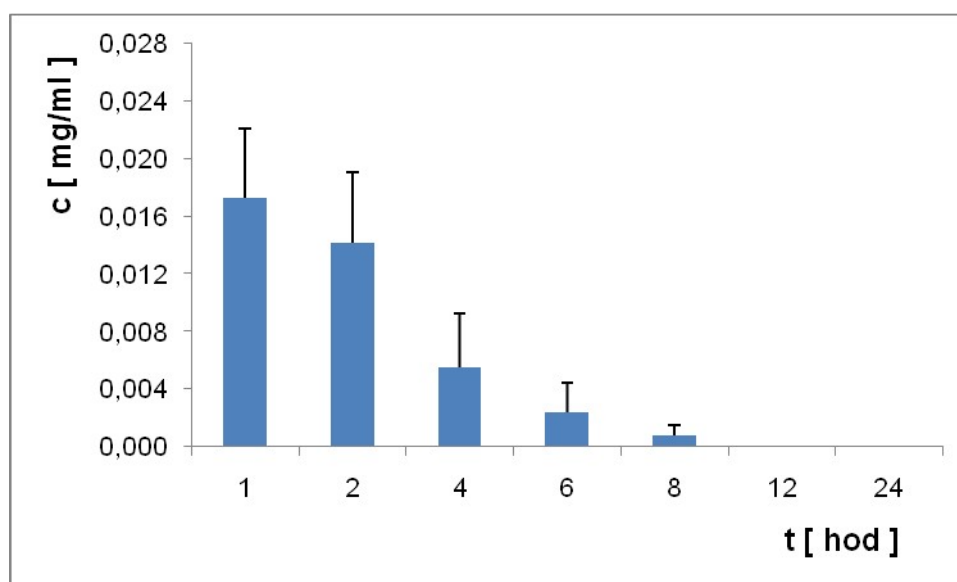
Degradace ibuprofenu v médiu pro jednotlivé kultivované kultury tabáku je uvedena v grafech 1-7. Ve vzorcích média odebraném po 1. hodině experimentu byly naměřené koncentrace ibuprofenu u všech tabákových kultivarů v rozmezí od 0,010 - 0,025 mg/ml. Dynamika odstraňování ibuprofenu z médií se však lišila. Koncentrace ibuprofenu v médiu nejrychleji klesala u *N. tabaccum* SR1, kdy po 6. hodině experimentu byla koncentrace ibuprofenu pouze 0,0008 mg/ml a při dalším odběru již nebyla měřitelná vůbec. V případě *N. tabaccum* cv. La Burley 21, *N. tabaccum* Zm-p60-1-T5, *N. tabaccum* TRI 2-T1 a *N. glauca* bylo léčivo odstraňováno nejdelší dobu. Ještě po 12. hodině experimentu byl v médiu ibuprofen obsažen (v rozmezí od pro *N. glauca* do 0,007 mg/ml pro *N. tabaccum* Zm-p60-1-T5). Po 24 hodinách již nebyl ibuprofen detekován v žádném médiu. Doba pro odstranění ibuprofenu u testovaných tabáků tedy klesala v pořadí: *N. tabaccum* SR1 > *N. tabaccum* Zm-p60-1-T4 > *N. tabaccum* TRI 2T2 > *N. glauca* > *N. tabaccum* TRI 2T1 > *N. tabaccum* cv. La Burley > *N. tabaccum* Zm-p60-1-T5.

Jako nejvhodnější se pro odstranění ibuprofenu z média jeví kultury *N. tabaccum* SR1. Zdá se, že GMO mají vliv na odstranění ibuprofenu, jelikož kultury

*N. tabaccum* TRI 2T1 i TRI 2T2 odstranily ibuprofen z média rychleji než *N. tabaccum* cv. La Burley 21. Doba pro odstranění ibuprofenu z média pro netransformované formy tabáku rostla v pořadí: *N. tabaccum* SR1 > *N. tabaccum* cv. La Burley > *N. glauca*.

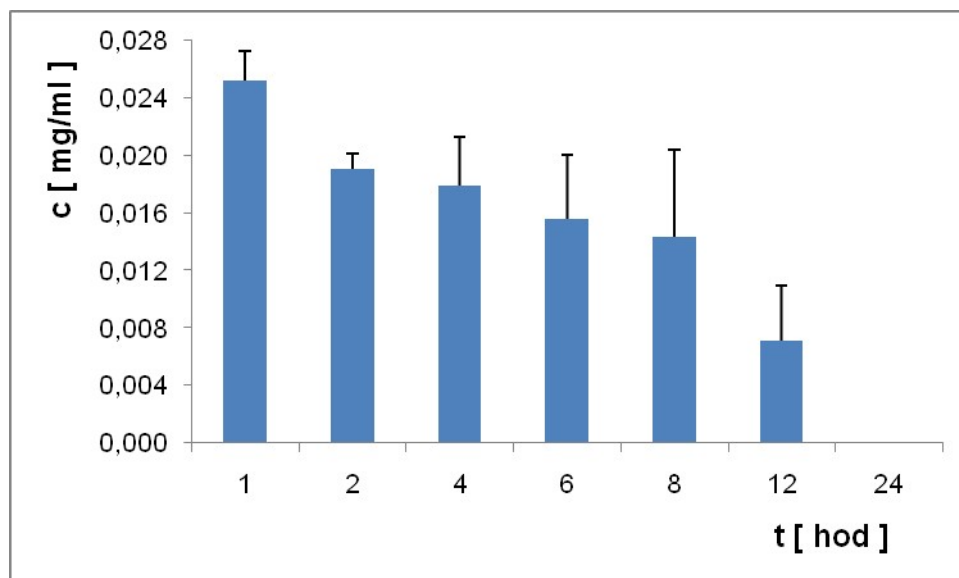


Graf 1. Koncentrace ibuprofenu v médiu pro *N. tabaccum* SR1 v jednotlivých odběrových časech.

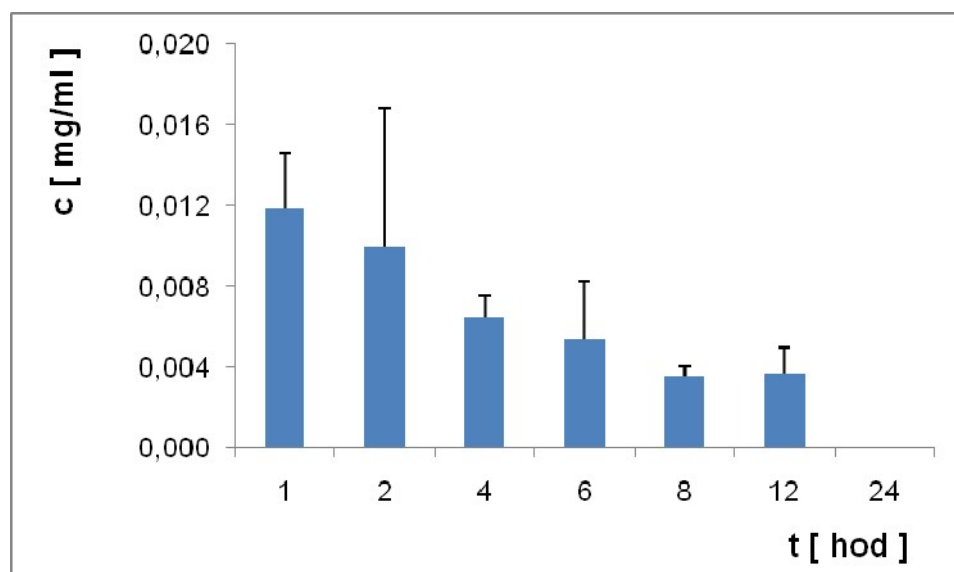


Graf 2. Koncentrace ibuprofenu v médiu pro *N. tabaccum* Zm-p60-1-T4 v jednotlivých odběrových časech.

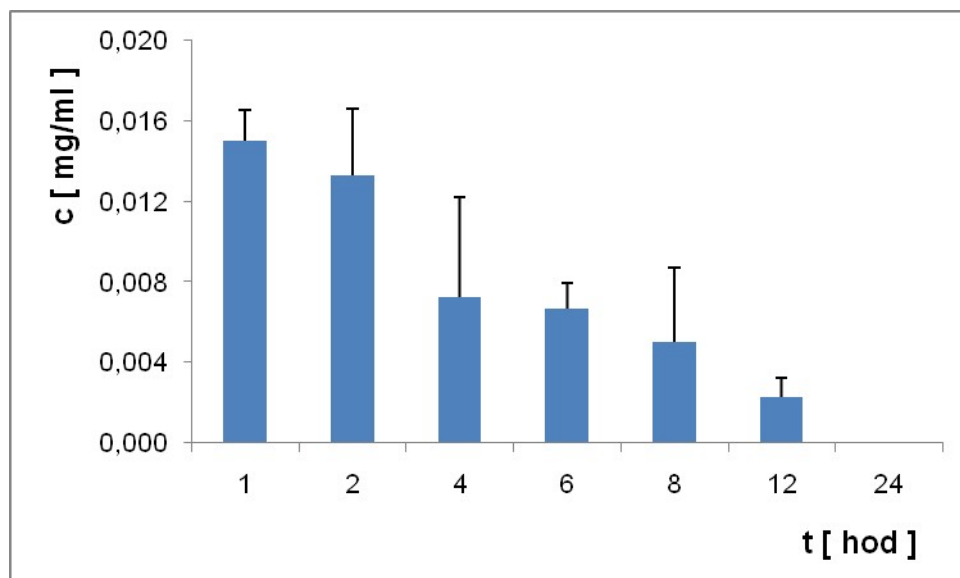




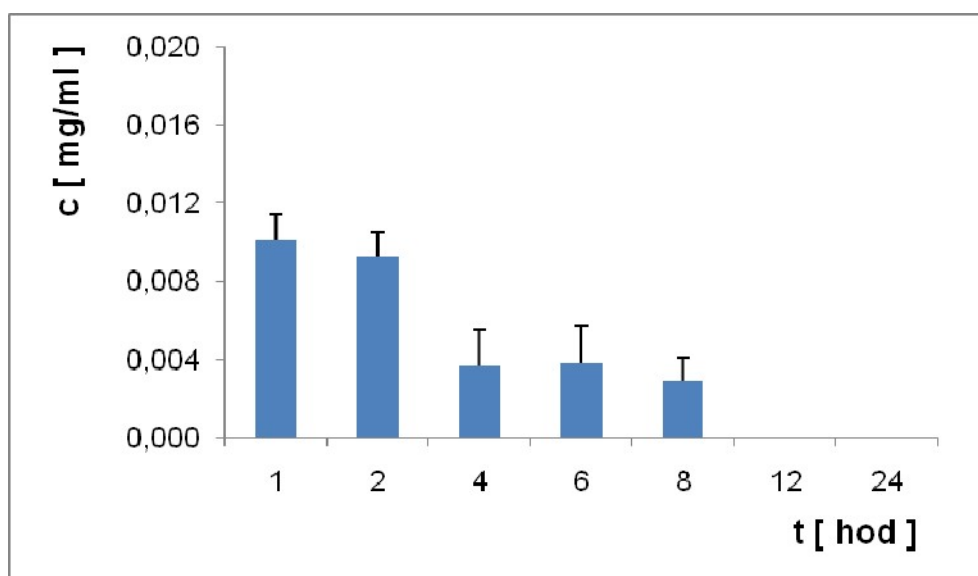
Graf 3. Koncentrace ibuprofenu v médiu pro *N. tabaccum* Zm-p60-1-T5 v jednotlivých odběrových časech.



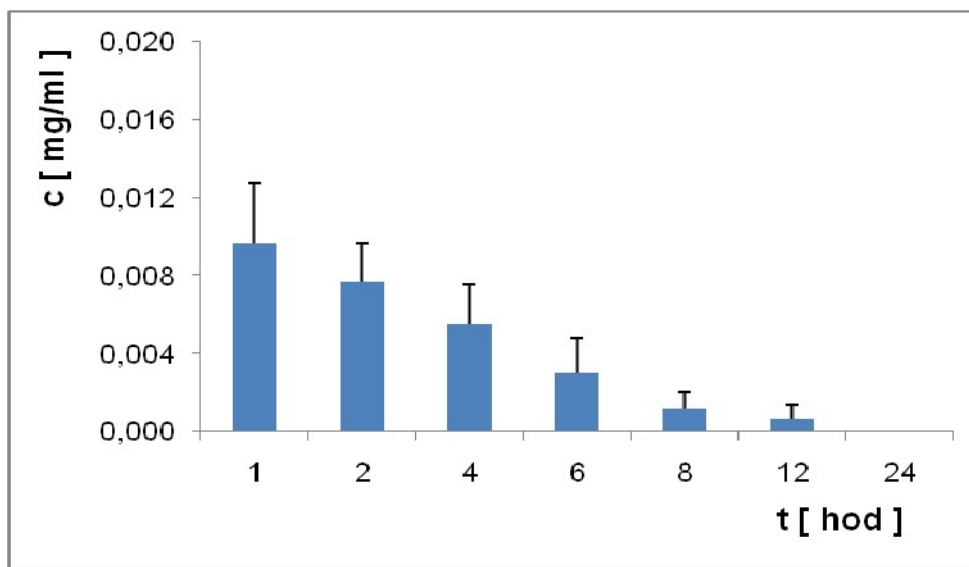
Graf 4. Koncentrace ibuprofenu v médiu kultury *N. tabaccum* cv. La Burley 21 v jednotlivých odběrových časech.



Graf 5. Koncentrace ibuprofenu v médiu pro *N. tabaccum* TRI 2-T1 v jednotlivých odběrových časech.



Graf 6. Koncentrace ibuprofenu v médiu pro *N. tabaccum* TRI 2-T2 v jednotlivých odběrových časech.



*Graf 7. Koncentrace ibuprofenu v médiu pro N. glauca v jednotlivých odběrových časech.*

## 5.2 Dlouhodobý experiment

Cílem experimentu bylo zjistit, zda je ibuprofen v delším časovém horizontu pro rostliny stresovým faktorem. Stresové odpovědi byly sledovány pomocí změn aktivit rostlinných enzymů, které se podílí na obranných mechanismech, jako peroxidáza (POX), kataláza (CAT), askorbát peroxidáza (APOX) a glutation-S-transferáza (GST). Byly použity suspenzní kultury rostlin *Nicotiana tabaccum* cv. La Burley 21, Zm-p60-1-T4, TRI 2-T2 a *Nicotiana glauca*, které rostly v kultivačním médiu s obsahem ibuprofenu 0,2 mM. Vzorke suspenzních kultur pod vlivem ibuprofenu i bez jeho přídavku byly odebírány po 1, 2, 4 a 8 dnech. Současně byla ihned na počátku experimentu pro kontrolu odebrána kultura bez léčiva. Následně stanovené hodnoty aktivity enzymů byly vztaženy na obsah proteinů (v jednotkách kat/mg proteinu).

### 5.2.1 Peroxidáza

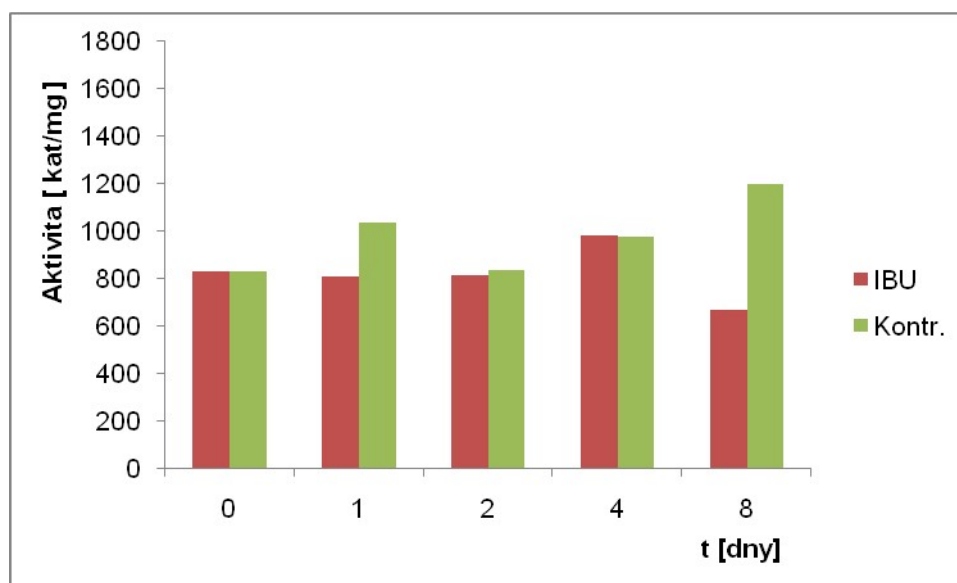
Aktivity POX v tabákových kulturách ovlivněné účinkem ibuprofenu a v kontrolách bez přídavku tohoto léčiva v závislosti na odběrových časech jsou shrnuty v grafech 8 - 11. Hladiny POX v buňkách *N.tabaccum* cv. La Burley 21 vystavených účinkům ibuprofenu byly srovnatelné s kontrolami a pohybovaly se v rozmezí 670-1200 kat/mg (graf 8). Pouze v osmém dni byla aktivita u kultury s přídavkem ibuprofenu výrazně nižší (poloviční) v porovnání s kontrolou. Zdá se tedy, že ibuprofen nebyl pro tuto kulturu stresovým faktorem.

U buněk *N.glauca* byla zaznamenána nejvyšší hodnota aktivity na počátku experimentu 1625 kat/mg (graf 9). Aktivity kontrolních buněk měly klesající tendenci, u buněk ošetřených ibuprofenem nejprve také docházelo k poklesu aktivit POX, ale po čtvrtém dni aktivita začala mírně růst. Čtvrtý a osmý den tak buňky ošetřené ibuprofenem vykazovaly vyšší POX aktivity než aktivity kontrolních neošetřených buněk. Důvodem tohoto zvýšení mohla být menší tolerance k ibuprofenu, čímž docházelo v buňkách k tvorbě ROS, které byly detoxifikovány pomocí POX. Pravděpodobně vznikla oxidovaná forma léčiva, která mohla POX aktivitu u této kultury také zvýšit.

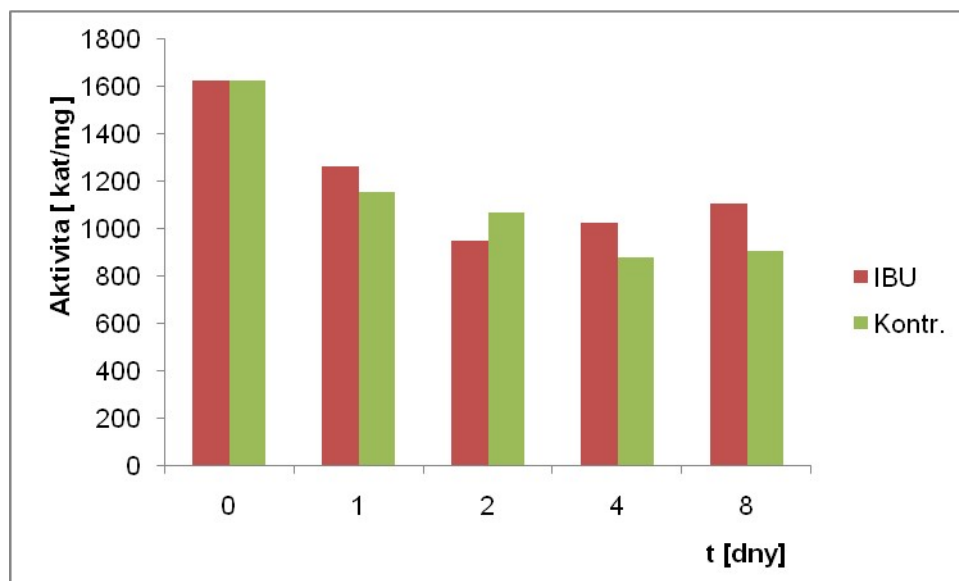
Transgenní kultivar *N.tabaccum* TRI 2-T2, odvozený od *N.tabaccum* cv. La Burley 21, obsahuje geny pro zvýšenou produkci fytochelatinů. POX aktivita byla zvýšená již první

den, kdy byla o 30% vyšší než aktivita u kontroly (graf 10). V dalších dnech aktivita v buňkách ošetřených ibuprofenem postupně klesala a osmý den byla dokonce nižší než u kontroly. Je známo, že fytochelatiny se podílejí na detoxifikaci nežádoucích polutantů. Proto mohlo právě u tohoto GMO dojít ke zvýšení aktivity POX u buněk vystavených účinkům ibuprofenu.

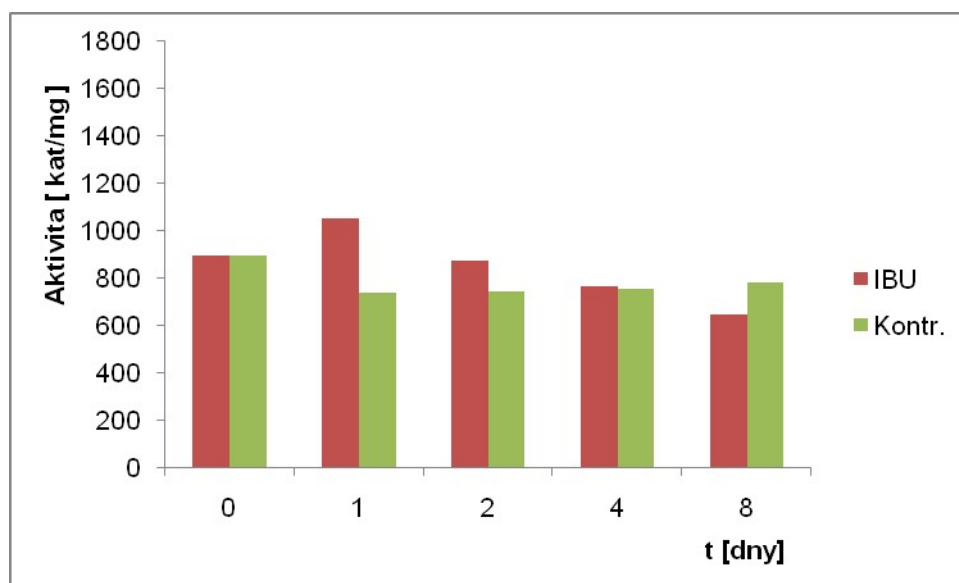
Nejnižší hladina POX byla nalezena u buněčné kultury *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4 (graf 11). V buňkách pod vlivem ibuprofenu klesla aktivita POX po jednom dni na 629  $\mu$ kat/mg proteinů. POX aktivity u kontrol kolísaly v rozmezí 828 – 1064 kat/mg a jen ve čtvrtém dni byla hladina enzymu vyšší v buňkách ošetřených ibuprofenem. GMO kultivar *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4 se od nemodifikovaných kultur liší přítomností genu pro  $\beta$ -glukosidázu. Vzhledem k tomu, že funkcí  $\beta$ -glukosidázy je přenos glykosidicky vázaných sacharidových zbytků na molekuly s OH skupinou, mohlo k této interakci dojít na molekule ibuprofenu a tím vytvořit pro rostlinný metabolismus méně toxickou látku.



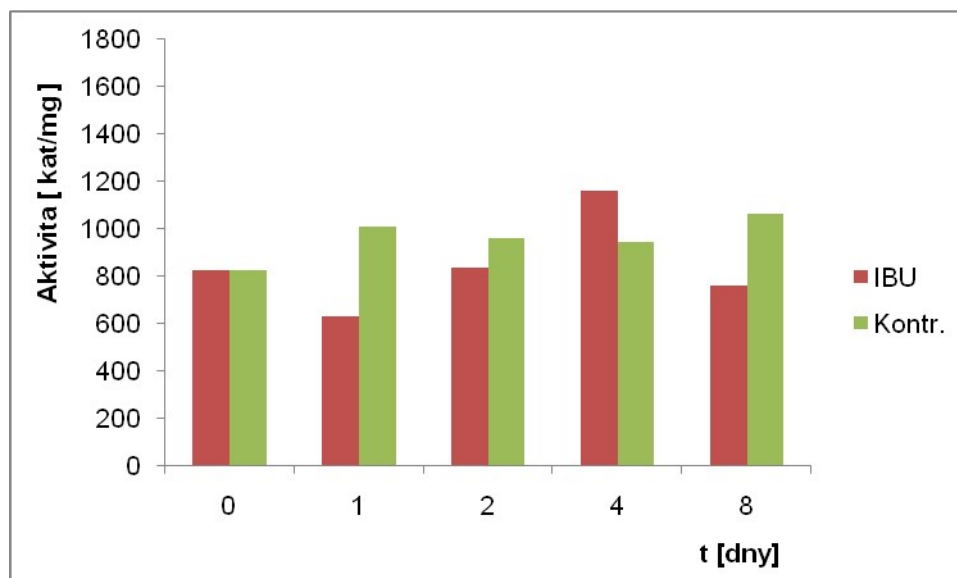
Graf 8. Aktivita peroxidázy v suspenzní kultuře *N. tabaccum* cv. La Burley 21 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 9. Aktivita peroxidázy u *N. glauca* s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 10. Aktivita peroxidázy u *N. tabaccum* TRI 2-T2 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 11. Aktivita peroxidázy u *N. tabaccum* Zm-p60-1-T4 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech

### 5.2.2 Kataláza

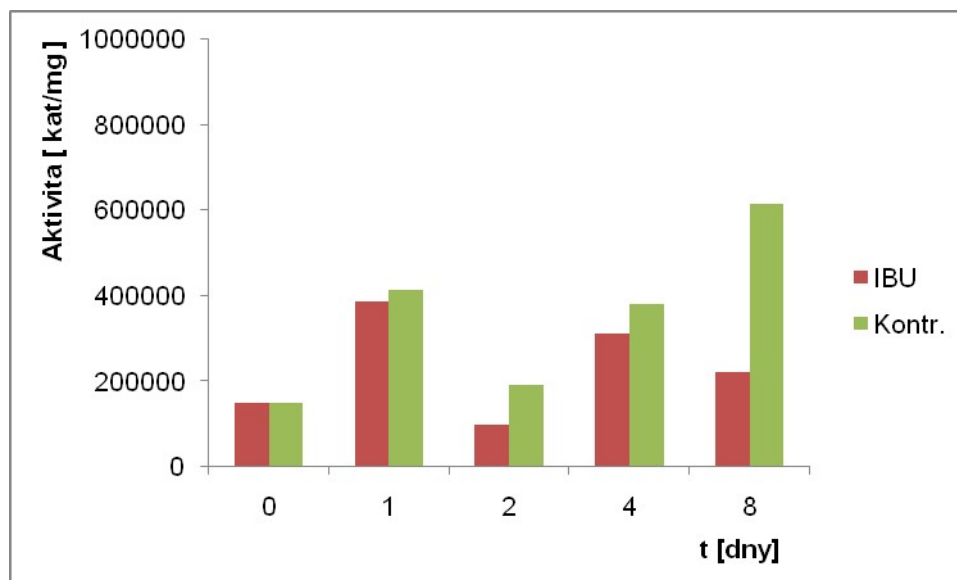
Katalázová aktivita u používaných tabákových kultur je shrnuta v grafech 12-15. Její hodnoty v jednotlivých odběrových časech velmi oscilují u všech studovaných kultur. Vzorky *N. tabaccum* cv. La Burley 21 vykazovaly nejnižší CAT aktivitu (graf 12), přičemž hladina CAT během experimentu významně kolísala jak u kontroly, tak u buněk ošetřených ibuprofenem. Na začátku experimentu byla aktivita přibližně 150 000 kat/mg, poté prudce narostla o zhruba 267%, následně prudce poklesla u kontrol o 54% a až o 75% u buněk ošetřených ibuprofenem. V kontrolních buňkách, odebraných v dalších dnech, aktivita CAT dále rostla, u buněk ošetřených ibuprofenem byl růst osmý den opět zastaven a aktivita se snížila.

V buňkách *N. glauca* byly hodnoty aktivity CAT vyšší u vzorků kultur s obsahem ibuprofenu v průměru o 13% (graf 13). Jen u kontrol byla po dvou dnech aktivita vyšší (703 398 kat/mg). Obecně můžeme říci, že aktivita v kontrolních i ošetřených buňkách rostla v čase. Teprve osmý den došlo ke snížení aktivity CAT, což mohlo být dáno i vyčerpáním živin z média.

Aktivita CAT v *N. tabaccum* TRI 2-T2 (graf 14) byla vysoká již na počátku experimentu (900 614 kat/mg), přičemž u kontrol aktivita čtyři dny postupně klesala

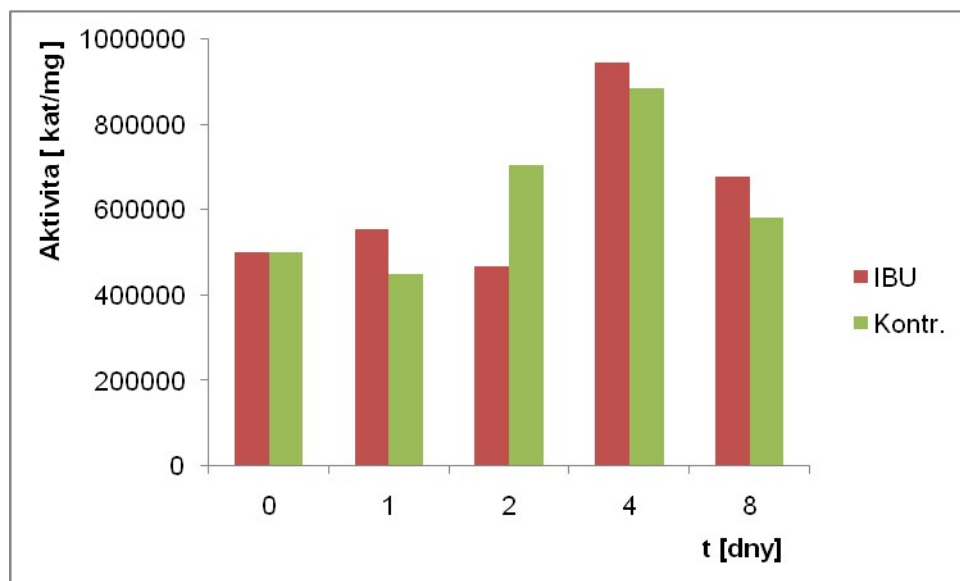
a poté se osmý den opět zvýšila. U vzorků ošetřených ibuprofenem aktivita velmi kolísala, ale z hodnot aktivit nevyplynuly žádné závislosti.

Zatímco u kultury *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4 s obsahem ibuprofenu aktivita CAT i přes vysokou počáteční hodnotu první dva dny rostla, u kontrolních vzorků ale docházelo k inhibici aktivity a osmý den byla aktivita CAT snížena až na polovinu počáteční aktivity (graf 15). Nejvyšší aktivita CAT byla naměřena u buněk s ibuprofenem odebraných po prvním a druhém dni (hodnoty nad 1 300 000 mkat/mg) . Zdá se, že vlivem přídavku ibuprofenu došlo ke zvýšené produkci  $H_2O_2$ , což buňky regulovaly zvýšenou hladinou CAT. Je známo, že CAT chrání buňky před nadměrnou akumulací tohoto silného oxidačního činidla, jelikož katalyzuje jeho rozklad. Navíc je CAT také schopna katalyzovat některé peroxidázové reakce v peroxizómech.

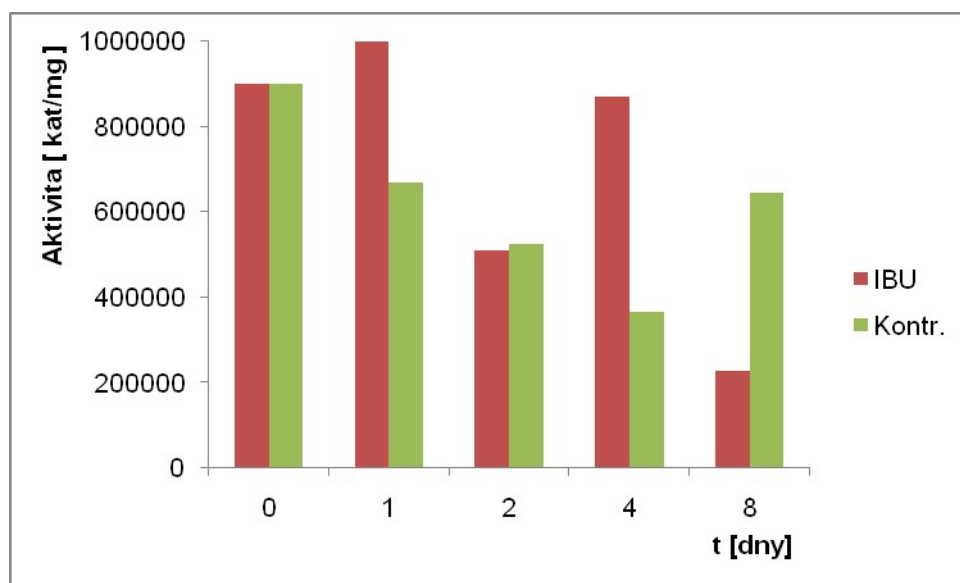


Graf 12. Aktivita katalázy u *N. tabaccum* cv. La Burley 21 s přídavkem ibuprofenu a bez přídavku léčiva v jednotlivých odběrových časech

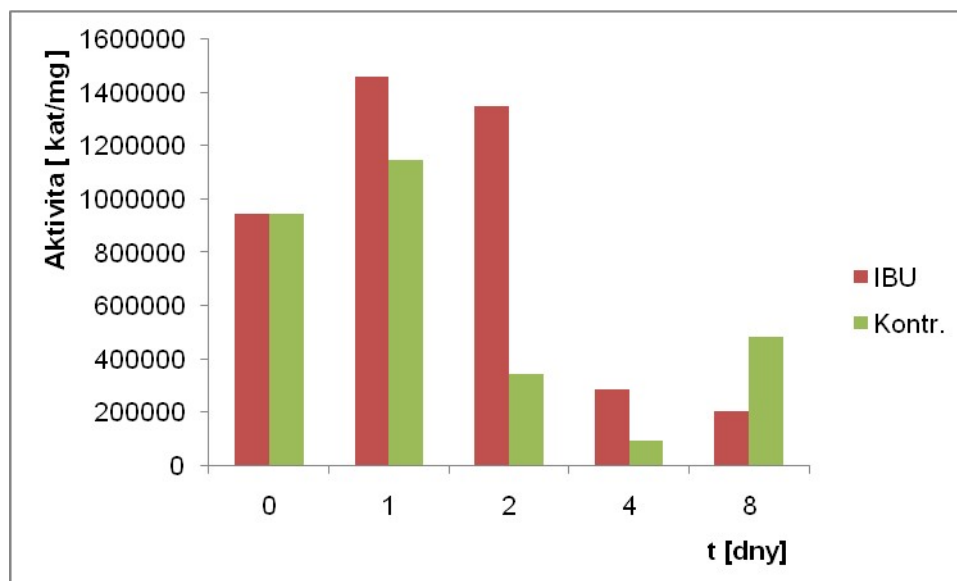




Graf 13. Aktivita katalázy u *N. glauca* s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 14. Aktivita katalázy u *N. tabaccum* TRI 2-T2 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



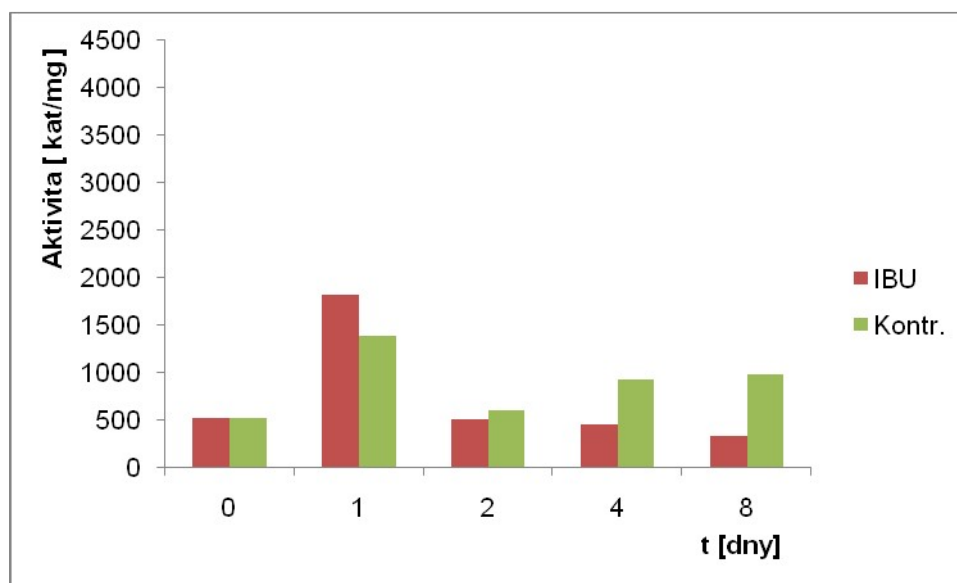
Graf 15. Aktivita katalázy u *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech

### 5.2.3 Askorbát peroxidáza

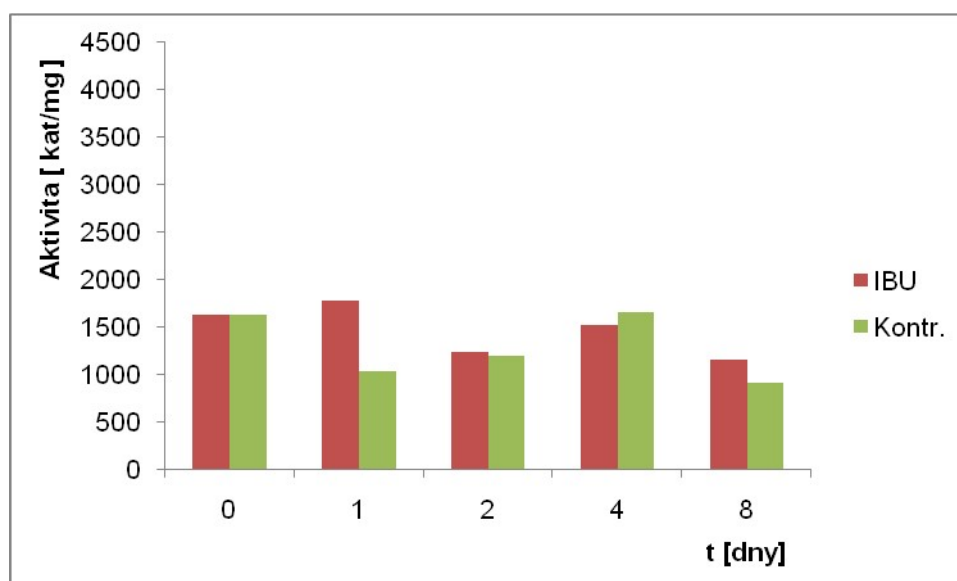
Nejnižší aktivita APX byla detekována u *N.tabaccum* cv. La Burley 21 (graf 16). Aktivita APX u vzorků s přidavkem ibuprofenu byla v porovnání s kontrolou nižší (okolo 500 kat/mg), jen v prvním dni tomu bylo naopak, aktivita APX u vzorku s ibuprofenem dosáhla 1815 kat/mg. V buňkách *N.glauca* byl zaznamenán podobný trend aktivity (graf 17). Po prvním dni experimentu byla opět výrazně vyšší u kultury s ibuprofenem.

GMO kultivary se však oproti předchozím, netransgenním kulturám lišily. U *N.tabaccum* TRI 2-T2 byly hodnoty aktivity APX nejvyšší na počátku experimentu a postupně klesaly, jak u vzorků s ibuprofenem, tak bez něj (graf 18). K odchylce došlo jen v posledním dni odběru, kde aktivita enzymu u kontroly vzrostla. Kultivar *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4 měl nejvyšší aktivitu APX také na počátku experimentu, 4013 kat/mg (graf 19). Ve srovnání vzorků této GMO kultury s přidavkem léčiva a bez přidavku, se celkově jevila aktivita APX vyšší ve vzorcích bez ibuprofenu. I když ve vzorcích kultury s ibuprofenem odebraných po prvních dvou dnech byla aktivita APX relativně vysoká a výrazně klesla až ve čtvrtém dni. U kontrolních vzorků bez přidavku ibuprofenu začala aktivita klesat již během druhého dne.

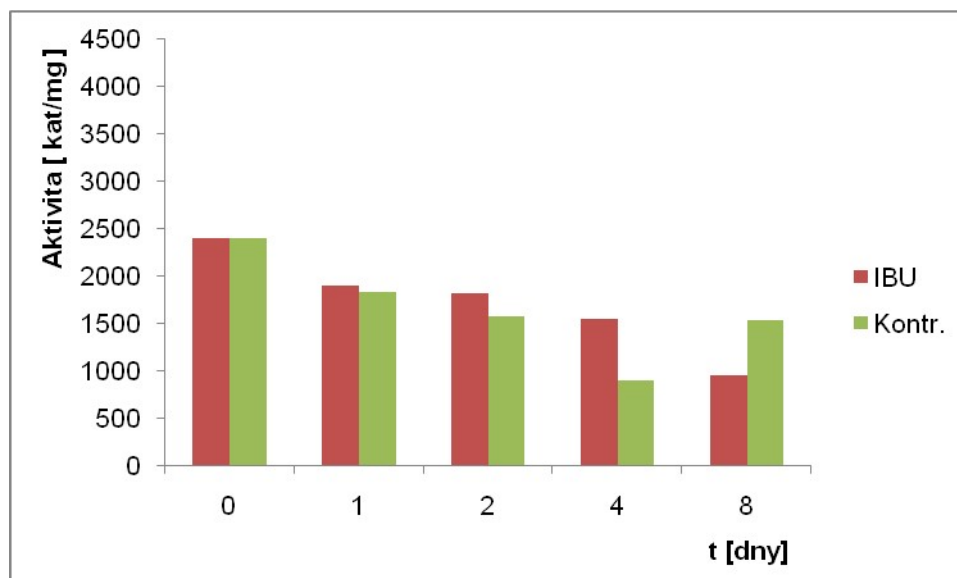
Obecně můžeme říct, že aktivita APX byla nejvyšší u GMO kultivarů, poté u *N.glauca* a nejnižší u *N.tabaccum* cv. La Burley 21. Zvýšené hodnoty aktivit opět předpokládají oxidativní stres, protože APX je součástí glutation-askorbátového cyklu, který reguluje i nižší hladinu  $H_2O_2$  v cytoplazmě. Oproti kataláze, která je schopná eliminovat až vyšší hladinu  $H_2O_2$  v chloroplastech, díky nízké afinitě k této sloučenině.



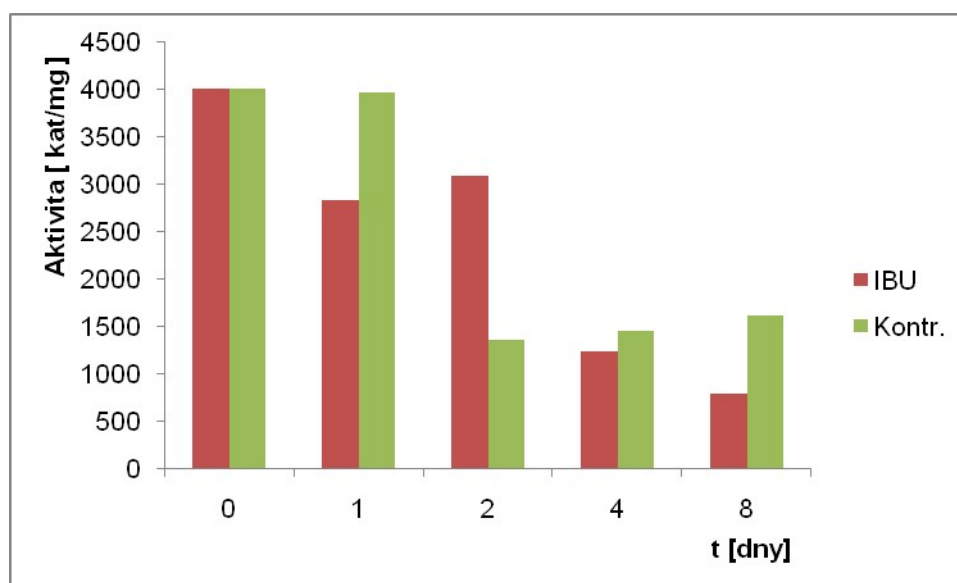
Graf 16. Aktivita askorbát-peroxidázy u *N. tabaccum* cv. La Burley 21 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 17. Aktivita askorbát-peroxidázy u *N. glauca* s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 18. Aktivita askorbát-peroxidázy u *N. tabaccum* TRI 2-T2 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 19. Aktivita askorbát-peroxidázy u *N. tabaccum* Zm-p60-1-T4 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech.

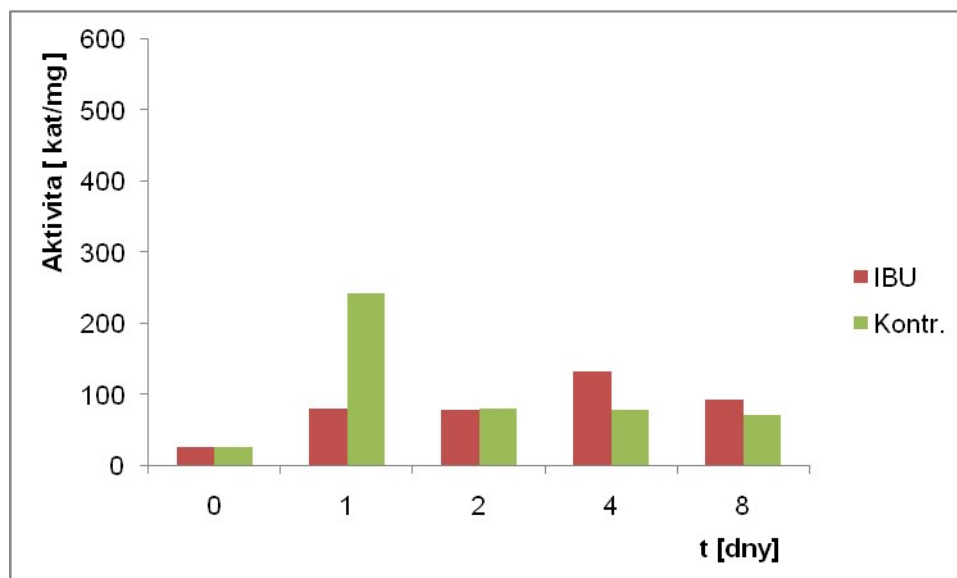
#### 5.2.4 Glutation-S-transferáza

Hladina GST byla nejnižší u *N.tabaccum* cv. La Burley 21. Hodnoty aktivity se pohybovaly okolo 100 kat/mg (graf 20). Pouze kontrola po druhém dni měla hodnotu o něco vyšší (243 kat/mg).

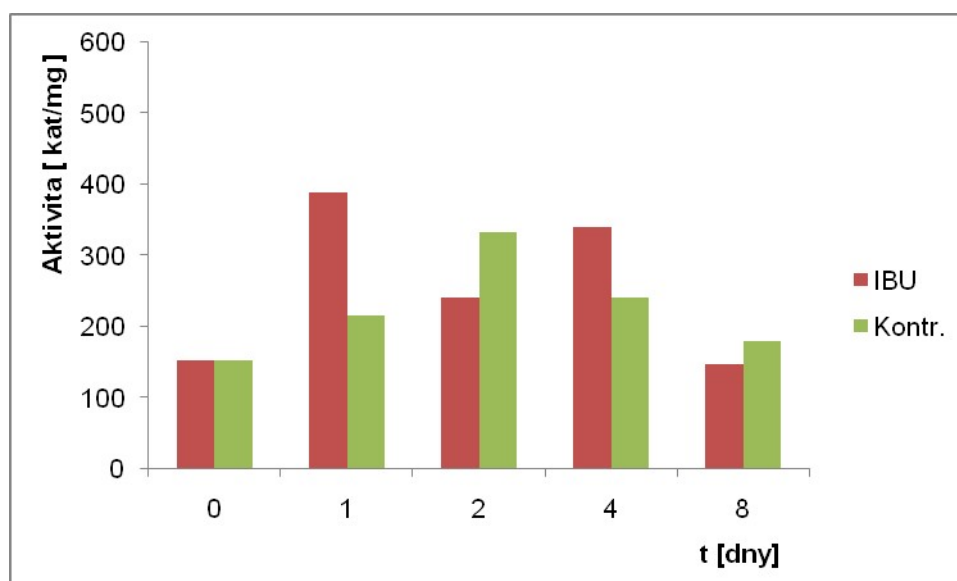
V buňkách *N.glauca* aktivita GST velmi oscilovala (graf 21). Hodnoty rostly mezi druhým a osmým odběrovým dnem. Ve druhém dni byla aktivita GST u kultury s přidavkem ibuprofenu dvojnásobná v porovnání s kontrolou. Po osmém dni byla ale opět na úrovni aktivity na počátku experimentu. Z těchto výsledků lze předpovědět, že ibuprofen se dostal do cytosolu buněk tabáku a vyvinul větší aktivitu tohoto přímého antioxidantu. Nejspíše byla v konjugační fázi detoxifikace ibuprofenu nutná zvýšená katalýza GST enzymem, aby vznikl hydrofilní konjugát.

Aktivita GST u kultur *N.tabaccum* TRI 2-T2 s ibuprofenem první den vzrostla a poté postupně klesla na hodnotu naměřenou v čase nula (graf 22). U kontrolních vzorků aktivita GST nevykazovala žádný určitý trend. V osmém dni byla hodnota, oproti počáteční aktivitě, dvojnásobná. Hodnoty aktivit GST však byly po celou dobu experimentu mnohem vyšší než aktivity naměřené u *N.tabaccum* cv. La Burley 21. Je známo, že GST napomáhá detoxifikaci organismu katalýzou reakce glutationu s xenobiotikem, a také že glutation je prekurzorem rostlinných chelatačních látek - fytochelatinů. Je tedy možné, že právě zvýšená syntéza fytochelatinů u GMO *N. tabaccum* TRI 2T2 měla vliv na vyšší aktivitu GST při detoxifikaci ibuprofenu.

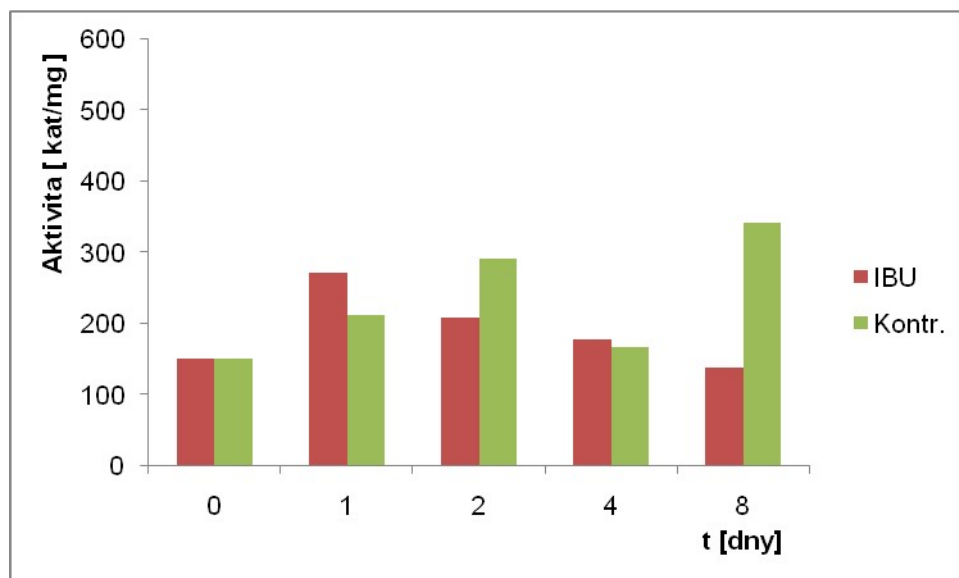
U buněk GMO *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4 byla naměřena nejvyšší hodnota GST aktivity vůbec. V případě kontroly došlo v prvním dni k růstu aktivity až na 810 kat/mg a až poté k výraznému poklesu (graf 23). Aktivita GST u buněk ošetřených ibuprofenem byla na začátku experimentu 716 kat/mg. V čase ale tato hodnota prudce klesala až na aktivitu cca 200 kat/mg.  $\beta$ -glukosidázy jsou v rostlinách aktivovány při poškození pletiva či při napadení patogeny. Zároveň se podílí na regulaci hladin rostlinných fytohormonů. To by vysvětlovala počáteční vyšší hladinu GST u tohoto GMO i následný pokles aktivity na úroveň *N.tabaccum* cv. La Burley 21.



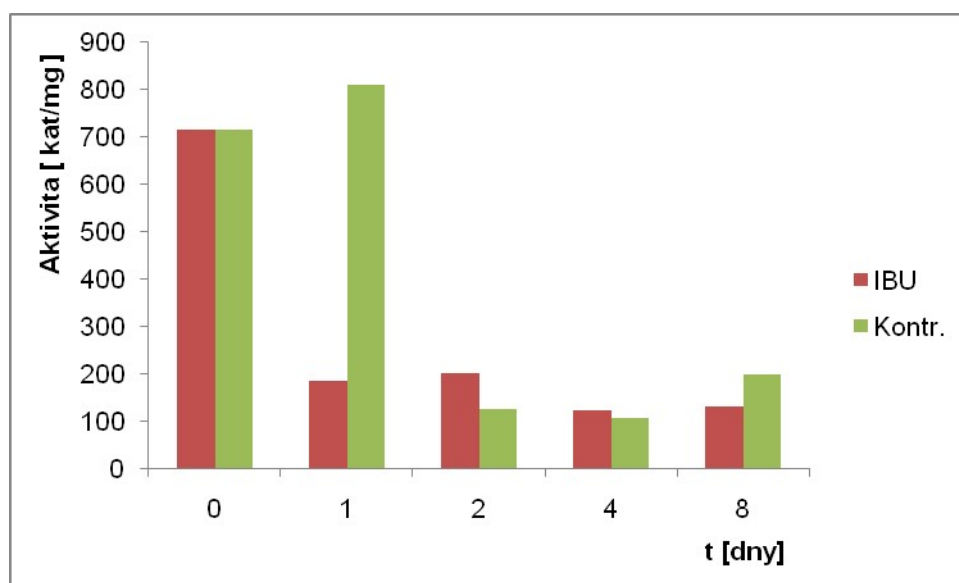
Graf 20. Aktivita Glutation-S-transferázy u *N. tabacum* cv. La Burley 21 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 21. Aktivita Glutation-S-transferázy u *N. glauca* s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 22. Aktivita Glutation-S-transferázy u *N.tabaccum* TRI 2-T2 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech



Graf 23. Aktivita Glutation-S-transferázy u *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4 s přidavkem ibuprofenu a bez přidavku léčiva v jednotlivých odběrových časech

## ZÁVĚR

Z krátkodobého experimentu vyplynulo, že v odstraňování ibuprofenu z média jsou mezi kultivary rozdíly. Jako nejvhodnější pro odstranění se jevila kultura *N. tabaccum* SR1. Zároveň je zřejmé, že GMO mají vliv na odstranění ibuprofenu, jelikož *N. tabaccum* TRI 2T1 i TRI 2T2 odstranily ibuprofen z média rychleji než *N. tabaccum* cv. La Burley 21. Na druhou stranu se ale nejpomaleji odstraňoval ibuprofen z média u *N. tabaccum* Zm-p60-1-T5. Ibuprofen byl z těchto médií zcela odstraněn až po 24 hodinách

Dlouhodobý experiment ukázal, že rostlinný stres se projevuje i po delším čase. Vlivem oxidativního stresu rostly hodnoty aktivity enzymů. Nejvyšší hladina POX byla zaznamenána u *N.glauca*. CAT měla ze všech stanovovaných enzymů jedno z největších čísel přeměny, zejména u GMO kultivarů *N. tabaccum* Zm-p60-1-T4 a TRI 2T2. Hladiny pro APOX byly nejvyšší u *N.tabaccum* Zm-p60-1-T4. Vyšší hladina GST v buňkách GMO *N. tabaccum* TRI 2T2 mohla být ovlivněna vneseným genem pro zvýšenou syntézu fytochelatinů.

Vzhledem k nejnižším hodnotám aktivit stanovovaných enzymů se *N. tabaccum* cv. La Burley 21 jevil jako nejvíce tolerantní kultivar k přítomnosti ibuprofenu. Hypoteticky mohl být ibuprofen degradován již v médiu s obsahem této suspenzní kultury. Jako nejméně tolerantní se zdál být druh *N.glauca*.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Kotyza J., Soudek P., Kafka Z., Vaněk T.: *Léčiva – „nový“ environmentální polutant*. Chemické listy 103, 540-547 (2009).
2. Soudek P., Petrová Š., Benešová D., Kotyza J., Vaněk T.: *Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti*. Chem. Listy 102, 346-352 (2008).
3. Cunningham D. S., Berti W. R., Huang W. J.: *TIBTECH 13*, 393(1995).
4. Pivetz B. E.: *Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites*. EPA/540/S – 01/500 (2001).
5. Kučerová P., Macková M., Macek T.: *Perspektivy fytoremediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí*. Chem. Listy 93, 19-26 (1999).
6. Abhilash P.C., Jamil Sarah, Singh Nandita.: *Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics*. Biotechnology Advances 27, 474–488 (2009).
7. Cunningham D. S., Berti W. R.: *Cell. Dev. Biol.* 29P, 207(1993).
8. Gabbrielli R., Mattioni C, Vergnano O.: *J. PlantNutr.* 14, 1067(1991).
9. Barz W, Ellis B. E.: *Bot. Ges.* 94, 1 (1981).
10. Anderson T. A., Guthrie E. A., Walton B. T.: *Bioremediation in the rhizosphere*. Environ. Sci. Technol. 27, 2630–2633 (1993).
11. Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., Jaffre, T.: *Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants*. Journal of Geochemical Exploration, roč. 7, č. 1, 49-57 (1977).
12. Willey N., Collins Ch.: *Phytoremediation of soils contaminated with radionuclides*. Radioactivity in the Environment, Volume 10, 43-69 (2007).
13. Nguyen Thi Hoang Ha, Masayuki Sakakibara, Sakae Sano: *Accumulation of Indium and other heavy metals by Eleocharis acicularis: An option for phytoremediation and phytomining*. Bioresource Technology, Volume 102, Issue 3, 2228-2234 (2011).
14. Brooks R. R., Chambers M. F., Nicks L. J., Robinson B.H.: *Phytomining*. Trends in Plant Science, Volume 3, Issue 9, 359-362 (1998).
15. Marchand L., Mench M., Jacob D.L., Otte M. L.: *Metal and metalloid removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of plants and standardized measurements: A review*. Environmental Pollution, Volume 158, Issue 12, 3447-3461 (2010).

16. Hanks J., Ritchie J. T.: *Am. Soc. Agron.* 31, 231 (1991).
17. Newman L.A., Strand S.E., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Ruszaj M., Shurleff B.B., Wilmoth J., Heilman P., Gordon M.P.: *Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars*. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1062-1067 (1997).
18. Morikawa H., Erkin Ö. C.: *Basis processes in phytoremediation and some applications to air pollution control*. *Chemosphere* 52, 1553-1558 (2003).
19. *Pharmaceuticals in Our Water Supplies*. College of Agriculture and Life Sciences. University of Arizona. Dostupné z URL: < <http://http://ag.arizona.edu/azwater/awr/july00/feature1.htm>> [cit. 29. 2. 2012].
20. SÚKL, Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné z URL: < <http://www.sukl.cz/hodnoceni-dodavek-distribuovanych-lecivych-pripravku-za-rok>> [cit. 29. 1. 2012].
21. Český statistický úřad. Dostupné z URL: < [http://www.czso.cz/csu/redakce.nsf/i/obyvatelstvo\\_lide](http://www.czso.cz/csu/redakce.nsf/i/obyvatelstvo_lide)> [cit. 29. 1. 2012].
22. SÚKL, Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné z URL: < <http://www.sukl.cz/hodnoceni-dodavek-distribuovanych-lecivych-pripravku-za-rok>> [cit. 29. 1. 2012].
23. Berrueta L. A., Gallo B. and F. Vicente F.: *A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments* (1995).
24. Seyman I.: *Hydroplus* 135, 21 (2003).
25. Sbíрка zákonů Česká republika. Dostupné z URL: < <http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2001/sb145-01.pdf>> [cit. 17. 3. 2012].
26. Vymazal J.: *Kořenové čistírny odpadních vod*. ENKI o.p.s., Třeboň (2004).
27. Forni C., Cascone A., Cozzolino S., Migliore L.: *Water Res.* 36, 3398 (2002).
28. Gujarathi N. P., Haney B. J., Linden, J. C.: *Phytoremediation* 7, 99 (2005).
29. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí*. *Chemické listy.* 95, 212-222 (2001).
30. Macek T., Macková M., Kas J.: *Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation*. *Biotechnology Advances.* 18, 23-34 (2000).
31. Singh O.V., Jain R.K.: *Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 63(2), 128-135 (2003).

32. Reichhart D.: *The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics*. *Plant Physiol.* 118, 1049-1056 (1998).
33. Stiborová M., Schmeiser H.H., Frei E.: *Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a komparative study*. *Phytochemistry.* 54(4), 353-362 (2000).
34. Sandermann H.: *TIB-TECH* 17, 82 (1992).
35. Dean J.V., Gronwald J.W., Anderson M.P.: *Glutathione S-transferase activity in nontreated and CGA-154281-treated maize shoots*. *Zeitschrift fuer Naturforschung.* 46, 850-855 (1991).
36. Bokern M., Harms H.H.: *Toxicity and Metabolism of 4-n-Nonylphenol in Cell Suspension Cultures of Different Plant Species*. *Environ. Sci. Technol.* , 31 (7), 1849–1854 (1997).
37. Hannink N.K., Rosser S.J., Bruce N.C.: *Phytoremediation of explosives*. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 21(5), 511-538 (2002).
38. Coleman, J.O.D. & Blake-kajff, M.M.: *Detoxification of xenobiotics by plants : chemical modification and vacuolar compartmentation*. *Science*, 1385 (97) (1997).
39. Gaillard C., Dufaud A., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N., Martinoia E.: *A herbicide antidote (skener) induces the aktivty of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide*. *Febs Letters* 352, 219-221 (1994).
40. Scandalios J. G.: *Adv. Genet.* 28, 1 (1990), Mittler R.: *Trends Plant Sci.* 7, 405 (2002).
41. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P.: *Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu*. *Chem. Listy* 99, 455 – 466 (2005).
42. Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F.: *J. Exp. Bot.* 53, 1227 (2002).
43. Ajay Arora, R.K.Sariam, G.C.Srivastava: *Oxidative stress and antioxidative system in plants*. *Current Science* Vol. 82, No. 10 (2002).
44. Český lékopis 1997. Ibuprofenum. Dostupné z URL: < <http://www.lekopis.cz> > [cit. 14. 11. 2011].
45. Hampl F., Rádl S., Paleček J.: *Farmakochemie*. VŠCHT. Praha
46. Hynie S.: *Farmakologie v kostce*. TRITON. Praha (2001).
47. University of Bristol, Faculty of Science. Dostupné z URL: < <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/ibuprofen/synthesis.htm>> [cit. 19. 1. 2012].
48. Lüllmann H., Mohr K., Hein L.: *Barevný atlas farmakologie*. Praha (2007).

49. Ternes T. A.: *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Res. 32, 3245–3260 (1998).
50. Doll T. E., Frimmel F. H.: *Chemosphere* 52, 1757 (2003).
51. Richardson M. L. and Bowron J. M.: *The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment*. J. Pharm. Pharmacol. 37, 1–12 (1985).
52. Buser H. R., Müller M. and Theobald N.: *Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea*. Environ. Sci. Technol. 32, 188–192 (1998).
53. Buser H. R., Poiger T. and Müller M. D.: *Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater*. Environ. Sci. Technol. 33, 2529–2535 (1999).
54. Ashton, D., Hilton, M., Thomas K.V.: *Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to stress in the United Kingdom*. Sci Total Environ 333, 167–184 (2004).
55. Parolini M., Binelli A., Provini A.: *Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 74, Issue 6, 1586-1594 (2011).
56. Saunders J.W., Bush L. P.: *Nicotine Biosynthetic Enzyme Activities in Nicotiana tabacum L. Genotypes with Different Alkaloid Levels* (1979).
57. Saunders J.W., Bush L. P.: *Accumulation, manipulation and regulation of nicotine content in tobacco*. In *Recent Advances in the Chemical Composition of Tobacco and Tobacco Smoke*. Proc Am Chem Soc Symp. New Orleans. pp 389-425 (1977).
58. Herbář Wendys. *Nicotiana tabacum - tabák virginský*. Dostupné z URL: <<http://botanika.wendys.cz/kytky/K387.php>> [cit. 23. 11. 2011].
59. BioLib. Biological Library Dostupné z URL: <<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id19460/?taxonid=40781>> [cit. 1. 2. 2012].
60. *Nicotiana glauca* Graham. Dostupné z URL: <<http://sdrsnet.srn.arizona.edu/data/sdrs/ww/docs/nicoglau.pdf>> [cit. 31. 1. 2012].
61. Saitoh, F., Noma M., and Kawashima N.: *The alkaloid content of sixty Nicotiana species*. Phytochemistry 24:477-480 (1985).
62. Baldwin, I.T., and P. Callahan.: *Autotoxicity and chemical defense: nicotine accumulation and carbon gain in solanaceous plants*. Oecologia 94(2):534-541 (1993).
63. Gentry, Jr., J.L., and D'Arcy W.G.: *Solanaceae of Mesoamerica*. In: *D'Arcy, W.G. (ed). Solanaceae, biology and systematics*. Columbia University Press, New York. 603 pp. (1986).

64. Usher, G.: *A dictionary of plants used by man*. Constable and Company, Ltd., 10 Orange St., London WC2H 7EG. 619 pp. (1974).
65. Parker, K.F.: *An Illustrated Guide to Arizona Weeds*. The University of Arizona Press, Tucson, AZ. 338 pp. (1972).
66. Huxley, A.: *The New RHS Dictionary of Gardening*; 4 vols. MacMillian Press, London (1992).
67. Curt, M.D., and Fernandez J.: *Production of Nicotiana glauca R.C. Graham aerial biomass in relation to irrigation regime*. Biomass 23:103-115 (1990).
68. Wawrzynski A.; Kopera E.; Wawrzynska A.; Kominska J.; Bal W.; Sirko A.: *Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants*. J. Exp. Botany. 57, 2173 – 2182 (2006).
69. Wang J, Sheehan M, Brookman H, Timko MP.: *Characterization of cDNAs differentially expressed in roots of tobacco (Nicotiana tabacum cv Burley 21) during the early stages of alkaloid biosynthesis*. Plant Sci. 8;158(1-2):19-32 (2000).
70. Kiran, N.S. et al.: *Ectopic over-expression of the maize beta-glucosidase Zm-p60.1 perturbs cytokinin homeostasis in transgenic tobacco*. Journal of experimental botany, 57(4), pp.985-96 (2006).
71. Murashige, T., Skoog, F.: *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum 15, 473-497 (1962).
72. Bradford M. M.: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem, 72, 248–254 (1976).
73. Drotar A., Phelps P., Fall R.: *Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells*. Plant Science, 42, 35-40 (1985).
74. Verma S., Dubey R.S.: *Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants*. Plant Science, 164,645-655 (2003).
75. Vanacker H., Carver T.L.W., Foyer C.H.: *Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves*. Plant Physiology, 117, 1103-1114 (1998).
76. Schröder P., Fischer C., Debus R., Wenzel A.: *Reaction of detoxification mechanisms in suspension cultured spruce cells (Picea abies L. Karst.) to heavy metals in pure mixture and in soil eluates*. Environ Sci Pollut Res 10(4), 225–234 (2003).