

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

ÚČINKY A METABOLISMUS ANTHELMINTIK V PÍCNINÁCH

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Nováková Anežka

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

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

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Lence Langhansové, Ph.D. za umožnění práce v Laboratoři rostlinných biotechnologií na Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR v Praze, za vedení v řešení úkolů, postupů a vyhodnocování výsledků.

Děkuji také RNDr. Lucii Stuchlíkové, Ph.D. za zpracování a analýzu vzorků a vedení při práci v laboratořích Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Dále děkuji vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za podnětné rady, metodickou a odbornou pomoc při zpracování mé práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Anežka Nováková

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.

Název diplomové práce: Účinky a metabolismus anthelmintik v pícech

Léčiva jsou potenciálně nebezpečnými kontaminanty životního prostředí. Vstup anthelmintik do životního prostředí je zejména exkrementy léčených zvířat. Anthelmintika mohou negativně ovlivňovat ekosystém svým působením na necílové organismy jako jsou rostliny a půdní mikroorganismy. Riziková je i akumulace léčiv v rostlinách. Konzumace těchto rostlin může podporovat rozvoj rezistence u helmintů. Tato práce se zabývala studiem vlivu a biotransformace často používaných anthelmintik albendazolu (ABZ), ivermektinu (IVM) a monepantelu (MOP) v pícech rostlinách vojtěšce seté (*Medicago sativa*) a jeteli lučním (*Trifolium pratense*). Pro vyhodnocení byly použity rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách a rostliny pěstované ve skleníku. Fytotoxicita byla sledována na semínkách a celých rostlinách měřením délky kořenů, stanovením obsahu prolinu, světlosběrných pigmentů a celkového obsahu proteinů. Po aplikaci IVM byla pozorována mírná fytotoxicita, ostatní anthelmintika neměla na většinu stanovovaných parametrů signifikantní vliv. Identifikace ABZ metabolitů probíhala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPL-MS/MS). Z výsledků vyplývá schopnost vychytávání a metabolizace ABZ v obou rostlinách. Na základě identifikovaných metabolitů byla navržena schémata metabolických drah ABZ. Většina metabolitů se dá považovat za deaktivované produkty, avšak část z nich je nestabilní a může být opět transformována na aktivní látky, které mohou dále působit v ekosystému.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Anežka Nováková

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Consultant: Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effects and metabolism of anthelmintics in fodder plants

Drugs are potentially dangerous contaminants of the environment. The entry of anthelmintics into the environment is mainly via excrement of treated animals. Anthelmintics can negatively affect the ecosystem by acting on non-target organisms such as plants and soil microorganisms. The accumulation of medicines in plants is also at risk. The consumption of these plants may promote the development of resistance in helminths. This thesis looked at the study of the influence and biotransformation of frequently used anthelmintics of albendazole (ABZ), ivermectin (IVM) and monepantel (MOP) in the forage plants of alfalfa seté (*Medicago sativa*) and the meadow clover (*Trifolium pratense*). Plants cultivated in in vitro conditions and plants grown in a greenhouse were used for evaluation. Phytotoxicity was monitored on seeds and whole plants by measuring the length of the roots, by determining the content of proline, light-collecting pigments and the total protein content. Mild phytotoxicity was observed after ivm administration, while other anthelmintics had no significant effect on most of the parameters determined. The identification of ABZ metabolites was carried out using high-performance liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (UHPL-MS/MS). The results show the ability to uptake and metabolise ABZ in both plants. Based on the identified metabolites, ABZ metabolic pathways schemes have been proposed. Most metabolites can be considered deactivated products, but some of them are unstable and can be transformed again into active substances that can continue to act in the ecosystem.

OBSAH

1	Úvod	6
2	Teoretická část	7
2.1	Helmini	7
2.1.1	Helmintózy	7
2.1.2	Terapie a prevence helmintóz	8
2.2	Anthelmintika	8
2.2.1	Makrocyklické laktony	9
2.2.2	Benzimidazoly	10
2.2.3	Nikotinová anthelmintika	11
2.2.3.1	Imidazothiazoly	11
2.2.3.2	Tetrahydropyrimidiny	12
2.2.4	Anthelmintika vybraná pro studium	13
2.3	Anthelmintická rezistence	15
2.3.1	Ovlivnění rezistence	16
2.3.2	Mechanismus vzniku rezistence	17
2.4	Humánní a veterinární léčiva v životním prostředí	18
2.4.1	Osud léčiv v životním prostředí	19
2.4.2	Koncentrace léčiv v životním prostředí	19
2.5	Stres u rostlin	20
2.5.1	Fytotoxicita anthelmintik	21
2.6	Xenobiotika v rostlinách	22
2.6.1	Enzymy metabolizující xenobiotika	23
2.6.1.1	Enzymy I. fáze biotransformace	24
2.6.1.2	Enzymy II. fáze biotransformace	25
2.6.1.3	Transportéry xenobiotik	26

2.7	Rostliny použité pro studium	27
2.7.1	Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	27
2.7.2	Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i>)	28
2.7.3	Vojtěška setá (<i>Medicago sativa</i>)	29
3	Cíl práce.....	30
4	Experimentální část	31
4.1	Materiál, pomůcky a přístroje	31
4.1.1	Chemikálie.....	31
4.1.2	Pomůcky.....	32
4.1.3	Přístroje	32
4.1.4	Biologický materiál	33
4.2	Metodika	34
4.2.1	Kultivace vojtěšky a jetele	34
4.2.2	Kultivace buněk <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
4.2.3	Vliv anthelmintik na viabilitu buněk rostlin.....	37
4.2.4	Vliv anthelmintik na růst klíčků vojtěšky	38
4.2.5	Stanovení kumulace prolinu v rostlinách	38
4.2.6	Stanovení obsahu světlosběrných pigmentů.....	39
4.2.7	Extrakce proteinů z rostlinného materiálu.....	40
4.2.8	UHPLC/MS analýza anthelmintik a jejich metabolitů v rostlinách	40
4.2.9	Statistické hodnocení.....	42
5	Výsledky	43
5.1	Vliv anthelmintik na viabilitu a proliferaci buněk	43
5.2	Testování fytoxicity anthelmintik	43
5.3	Vliv anthelmintik na kumulaci prolinu	44
5.4	Vliv anthelmintik na obsah pigmentů	45
5.5	Stanovení vlivu anthelmintik na celkový obsah proteinů	46

5.6	Sledování metabolismu ABZ v rostlinách	49
5.6.1	Stanovení metabolitů ABZ ve vojtěšce	49
5.6.2	Stanovení metabolitů ABZ v jeteli	51
6	Diskuse	52
7	Závěry	58
8	Seznam zkratek	59
9	Seznam použité literatury	60

1 Úvod

Kontaminace životního prostředí představuje vysoké a často dlouhodobé riziko pro lidské zdraví i pro ekosystémy. Stav životního prostředí a jeho udržení pro další generace je stále častější otázkou v naší společnosti (Holoubek, 2017).

Znečišťující látky mají různé zdroje, pravděpodobně nejnebezpečnější pochází ze současné i bývalé průmyslové a vojenské činnosti (Kibblewhite, 2019). Za jedny z nejčastějších kontaminantů se považují i léčiva. Do ekosystému se dostávají různými cestami např. odpadními vodami, hnojením půdy nebo přímým vylučováním do prostředí. Léčiva pak mohou ovlivňovat všechny struktury prostředí, může docházet ke znečištění pitných vod či k akumulaci v hospodářských potravinách. Navíc výskyt léčiv v životním prostředí může podporovat vznik rezistencí u patogenních organismů. Byly publikovány studie dokládající přítomnost léčiv ve všech složkách životního prostředí a jejich účinky na nejrůznější organismy. Bylo tak potvrzeno, že léčiva v životním prostředí jsou rizikem globálního charakteru (Küster a Adler, 2014).

Většina populace si nepřeje mít biologicky aktivní látky v životním prostředí, potenciálně tak i v pitné vodě a v potravinách, čím se následně mohou dostat do organismu člověka. Proto se současné studie čím dál více zajímají o osud léčiv v životním prostředí a zároveň různými kroky dochází ke snaze o minimalizaci množství léčiv v prostředí (Küster a Adler, 2014).

2 Teoretická část

2.1 Helminti

Helminti jsou červi parazitující v těle zvířat i lidí. Červi nebo jejich infekční stádia způsobují u hostitelů tzv. helmintózy. Infekce hospodářských zvířat těmito červy vede ke zhoršení zdravotního stavu zvířat a následně ke snížení produktivity a ekonomickým ztrátám zemědělců. (Dyary, 2015).

Podle místa vývojového cyklu dělíme červy na biohelminty, u kterých vývojové cykly probíhají ve vnitřním prostředí hostitele, nebo geohelminty, kde vývojové cykly probíhají v životním prostředí zvířat (Lamka a Ducháček, 2014).

2.1.1 Helmintózy

Helmintózy způsobují tři skupiny červů, jsou to hlístice (oblí červi) – *Nematoda*, motolice (ploší červi) – *Trematoda* a tasemnice – *Cestoda*.

Nematodóza jsou nejrozsáhlejší skupinou helmintóz, postihují prakticky všechny druhy hospodářských i zájmově chovaných zvířat. Nematoda mají vývojový cyklus převážně jako geohelminti, velmi omezeně jako biohelminti (Lamka a Ducháček, 2014). Ke vzniku infekce dochází požitím larválního stádia červa nebo vajíček obsahující larvy, výjimečně mohou infekční larvy do organismu penetrovat kůží (Taylor et al., 2007). Dospělci jsou nejčastěji v definitivním hostiteli lokalizováni v trávicím traktu, v menší míře se mohou vyskytovat i v dalších soustavách zejména v krevním a lymfatickém systému, nervové soustavě a urogenitálním traktu (Volf a Horák, 2007).

Trematodózy představují skupinu helmintóz závažných především pro hospodářská a volně žijící zvířata, včetně ryb (Lamka a Ducháček, 2014). Trematoda jsou biohelmintickými parazity, pro svůj životní cyklus obvykle vyžadují dva meziphostitele. První meziphostitel je zpravidla měkkýš (Volf a Horák, 2007). Ke vzniku infekce u zvířat dochází požitím larválních stádií nebo infikovaného meziphostitele. V konečném hostiteli se vyskytují především ve žlučovodech, zažívacím traktu a cévním systému (Taylor et al., 2007).

Cestodózy mají menší rozsah působení oproti předchozím helmintózám, postihují hlavně domácí zvířata a ryby. Cestoda mají vývojový cyklus biohelminta s více meziphostiteli, méně často s jedním nepřímým hostitelem. Ke vzniku infekce dochází

perorálně pozřením infikovaného meziphostitele. V konečném hostiteli se až na výjimky vyskytují v tenkém střevě (Taylor et al., 2007). Závažné veterinární i humánní infekce mohou způsobovat dospělci i červi ve stádiu larev (Volf a Horák, 2007).

2.1.2 Terapie a prevence helmintóz

Léčba helmintóz je závislá výhradně na terapii anthelmintiky (Dyary, 2015). Anthelmintické účinky má mnoho léčiv různé struktury. Jedná se většinou o látky syntetického původu, některé z nich jsou získávány biosynteticky. Podle účinku na cílový organismus rozlišujeme anthelmintika na antinematoda, antitrepatoda a anticestoda. Většina látek má současně účinky proti více třídám červů. Některé z nich mohou mít účinek i proti původcům zevních parazitóz, takové označujeme jako antiendektoparazitika tzv. endektocida (Lamka a Ducháček, 2014).

Možností prevence helmintóz je zásah do životního cyklu parazitů např. omezením disperze a dalšímu šíření vajíček červů v exkrementech a moči definitivních hostitelů. Další možností prevence je tlumení populace meziphostitelů např. vodohospodářskými zásahy lze omezit množství měkkýšů jako meziphostitelů trematod. Při zásahu do životního prostředí je však třeba zvážit vliv na celý ekosystém. Na základě znalostí životních cyklů a meziphostitelů konkrétních červů, lze snížit riziko přenosu na definitivního hostitele např. omezením kontaktu s vodními plochami v případě penetrujících nematod nebo zajištěním konzumace správně tepelně upravených potravin v případě cestod (Volf a Horák, 2007). Na prevenci helmintóz se do určité míry také podílí vakcinace hostitelů. Dodržování zoohygienických opatření je nedílnou součástí prevence i léčby helmintóz (Lamka a Ducháček, 2014).

2.2 Anthelmintika

Anthelmintika jsou léčiva užívaná k redukci množství parazita na tolerovatelnou hodnotu, zabitím (např. léčivo *hlistocidné*) nebo inhibicí růstu a paralýzou parazita (např. léčivo *hlistopudné*). Anthelmintika také omezují hromadění infekčních larev na pastvinách nebo vajíček v životním prostředí.

Anthelmintika se mohou dělit na základě podobnosti v chemické struktuře a mechanismu účinku. Podle struktury klasifikujeme: benzimidazoly, imidazolthiazoly,

tetrahydropyrimidiny, organofosfáty, makrocyklické laktony, amino-acetonitrilové deriváty. Mechanismy účinku jednotlivých skupin jsou rozdílné, a i jednotlivé látky mohou vykazovat více možných mechanismů. Mohou působit např. jako agonisté nikotinu nebo kyseliny γ -aminomáselné. Dalším možným účinkem je aktivace ligandem řízených chloridových kanálů, zvýšení permeability membrán pro vápník, vazba na β -tubulin nebo inhibice malátového metabolismu, kys. arachidonové nebo fosfoglycerát-kinasy. Na základě spektra účinnosti lze anthelmintika klasifikovat jako: širokospektré (s účinkem na různé druhy červů) nebo úzkospektré (účinné na jeden či dva druhy) (Enejoh a Suleiman, 2017).

Za první generaci širokospektrálních anthelmintik se považuje zavedení fenothiazinu a piperazinu v polovině 20. století. Druhou generací v 60. letech byla skutečně širokospektrá léčiva s mnohem širším spektrem účinku oproti první generaci. Do druhé generace anthelmintik patří benzimidazoly, probenzimidazoly a tetrahydropyrimidiny. Na počátku 90. let se objevily širokospektrální makrocyklické laktony. Kromě uvedených skupin jsou na trhu dostupné i sloučeniny s užším spektrem, do nichž patří substituované salicylanilidy, fenoly a organofosfáty (Module 2. Helminths: anthelmintic resistance: diagnosis, management and prevention, 2004).

2.2.1 Makrocyklické laktony

Makrocyklické laktony jsou skupinou velmi hydrofobních léčiv s prodlouženým účinkem (Enejoh a Suleiman, 2017). Jedná se o biosyntetické produkty aktinomycet z půdy (Maddison et al., 2008). Jsou považovány za nejrozšířenější širokospektrá antiparazitika ve veterinární medicíně (Enejoh a Suleiman, 2017).

Jsou děleny na avermektiny (disacharidy nebo monosacharidy) a milbemyciny (deglykosylované analogy). Do skupiny avermektinů patří ivermektin (IVM), doramektin, abamektin a další. Do skupiny milbemycinů pak patří moxidektin a milbemycin oxim (Maddison et al., 2008).

Mechanismem účinku je otevření **ligandem řízených chloridových kanálů** v buněčné membráně, a tím způsobená hyperpolarizace membrán. Cílovým místem účinku v těle parazitů jsou chloridové kanály řízené kyselinou γ -aminomáselnou a/nebo glutamátem. Díky hyperpolarizaci membrán dochází k redukci motorické aktivity a následné paralýze červa. Změna polarity také způsobí ochrnutí faryngeální pumpy

nezbytné pro příjem potravy, což má za následek vyhladovění parazita. K zániku červů tak dochází kombinací nervových a svalových účinků (Maddison et al., 2008).

Makrocyclické laktony jsou účinné na endo- i ektoparazity, považují se tedy za endektocidy. Endoparazitivní účinek je selektivní pouze na nematoda kvůli absenci vazebných míst v cestodách a trematodách. Nedostatečný průnik přes hematoencefalickou bariéru do centrální nervové soustavy a vylučování xenobiotik P-glykoproteinem snižuje u savců toxicitu a zajišťuje selektivitu účinku na parazity (Maddison et al., 2008).

2.2.2 Benzimidazoly

Benzimidazoly jsou největší skupinou antinematod odvozených od jedné chemické struktury (Maddison et al., 2008). Benzimidazoly mají nízkou rozpustnost ve vodě a špatnou absorpci z gastrointestinálního traktu, kterou lze zvýšit současným podáváním s tučným jídlem. Aktivita účinku je závislá na délce přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách a tkáních. Obvykle je proto třeba podávat opakované dávky po dobu 3-5 dnů v závislosti na citlivosti parazita a množství použité dávky. Stejně účinné mohou být ale i jednotlivé dávky při použití vysokých koncentrací léčiva (Maddison et al., 2008).

Benzimidazolová anthelmintika dělíme na karbamáty (albendazol (ABZ), fenbendazol, mebendazol, flubendazol, oxibendazol, oxfendazol) a thiazoly (thiabendazol, kambendazol). Proléčiva, probenzimidazoly, mají účinek až po metabolické aktivaci hostitelem. Vyznačují se lepší rozpustností oproti původní účinné látce. Mezi proléčiva patří febantel, který má stejnou účinnost jako jeho hlavní metabolity fenbendazol a oxfendazol. Mezi zástupce halogenovaných benzimidazolů patří triklabendazol s úzkým spektrem účinku (Enejoh a Suleiman, 2017).

Mechanismem účinku benzimidazolů je **inhibice β -tubulinových podjednotek**, která v buňkách parazita způsobí inhibici formování mikrotubulů. Mikrotubuly jsou intracelulární struktury, které tvoří základ cytoskeletu buňky, umožňují transport částic a pohyb chromozomů při buněčném dělení, jsou spojeny s energetickým metabolismem a exocytózou. Vazba na specifická vazebná místa na β -tubulinu vede k rozvoji abnormální konformace tubulinových podjednotek, zejména pak v rychle se dělících buňkách, která brání další polymeraci podjednotek a vede k zániku celého organismu.

Některá z benzimidazolových anthelmintik (flubendazol, mebendazol) inhibují mikrotubulární seskupení absorpčních intestinálních buněk, což vede k akumulaci sekrečních granulí v cytoplazmě a zabránění schopnosti absorpce živin. Důsledkem je redukce glykogenu s poškozením buněčných stěn a vyhladovění parazita. Dalším účinkem souvisejícím s tubulinem je útlum vývoje parazita způsobený inhibicí mikrotubulárních procesů při vývoji vajíčka (SPC Flimabend). Ve vysokých koncentracích mají benzimidazoly několik nespecifických účinků na nematoda např. inhibici fumarátreduktas, což působí blokádu tvorby energie v mitochondriích a inhibici vstřebávání cukrů ze střev (Maddison et al., 2008).

V závislosti na specifických charakteristikách molekul může antiparazitické spektrum benzimidazolů zahrnovat nematoda, cestoda, trematoda a určitá protozoa, výjimečně mohou mít i antimykotickou aktivitu (thiabendazol). Většina léčiv této skupiny působí proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé mají i ovocidní účinky (Maddison et al., 2008). Afinita k parazitárnímu β -tubulinu je mnohem vyšší než k β -tubulinu savců, čímž je snížen toxický účinek léčiv na savce (SPC Flimabend).

2.2.3 Nikotinová anthelmintika

Mezi nikotinová anthelmintika patří skupina imidazothiazolů a tetrahydropyrimidinů (Maddison et al., 2008).

Účinkují ve svalových buňkách parazitů jako selektivní agonisté synaptických a postsynaptických **nikotinových acetylcholinových receptorů**. Prodloužením aktivace excitačních receptorů vyvolávají spastickou paralýzu svalstva (SPC Dolpac). Bylo identifikováno množství podtypů těchto receptorů, které jsou odlišně exprimovány různými parazity. Imidazothiazoly jsou účinnější k L-subtypu a tetrahydropyrimidiny k N-podtypu receptorů (Maddison et al., 2008).

2.2.3.1 Imidazothiazoly

Tetramisol byl první z imidazothiazolové skupiny anthelmintik, jedná se o směs dvou optických isomerů. Za účinnost proti nematodům je zodpovědný levotočivý izomer (levamisol). Aby byla zajištěna dostatečná koncentrace L-isomeru je antiparazitární účinnost podmíněna vysokou dávkou tetramisolu. Pokud se však levamisol užívá

samostatně, je možné snížit dávku oproti tetramisolu na polovinu. Zvyšuje se tak bezpečnost užívání se zachováním anthelmintické účinnosti (Enejoh a Suleiman, 2017). Levamisol mimo agonistického účinku na nikotinové acetylcholinové receptory, přímo inhibuje acetylcholinesterasu, tím se ještě více prodlužuje účinek acetylcholinu na synapsích a následující neuromuskulární blokádu (SPC Codiverm).

Mezi imidazothiazolové anthelmintika dále patří derivát levamisolu butamisol (Enejoh a Suleiman, 2017).

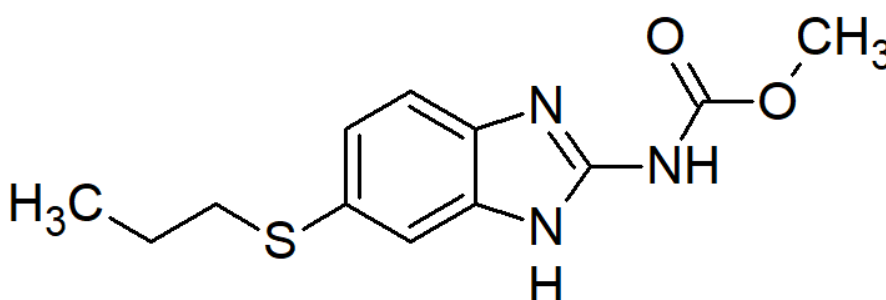
2.2.3.2 Tetrahydropyrimidiny

Zástupci skupiny jsou pyrantel a jeho deriváty morantel a oxantel. Pyrantel a oxantel jsou na receptorech stonásobně účinnější než acetylcholin (Enejoh a Suleiman, 2017). Vzájemné podávání těchto dvou léčiv může mít terapeutické výhody s vyšším spektrem účinnosti a může snižovat potenciál vzniku rezistence. Někteří parazité se při vystavení vysokým dávkám tetrahydropyrimidinů rychle zotavují zřejmě díky desenzibilizaci receptorů. To naznačuje, že nižší dávky podávané opakovaně případně trvale, mohou mít větší terapeutický efekt (Maddison et al., 2008).

2.2.4 Anthelmintika vybraná pro studium

Albendazol je širokospektrální anthelmintikum ze skupiny benzimidazolů pravděpodobně s nejširším spektrem z této skupiny. Jedná se o důležitou antiparazitickou látku užívanou u přežvýkavců (ovce a skot). Indikován je proti různým nematodám, trematodám, cestodám a prvokům. Má ovocidní účinky, čímž snižuje kontaminace pastvin (Maddison et al., 2008).

Vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě se z gastrointestinálního traktu vstřebává omezeně (u dobytka asi 50 % perorálně podávané dávky). Po absorpci dochází při prvním průchodu játry k rychlé metabolizaci. Sulfidová funkční skupina se oxiduje na farmakologicky aktivní metabolit ABZ sulfoxid. V dalším pomalejším kroku metabolizace vzniká již neaktivní ABZ sulfon. Následuje deacetylace karbamátové skupiny a vznik ABZ 2-aminosulfonu (SPC Alphalben). Z podané dávky se 60 % vyloučí močí ve formě různých metabolitů, hlavním vylučovaným metabolitem je ABZ sulfoxid (SPC Aldiverm).

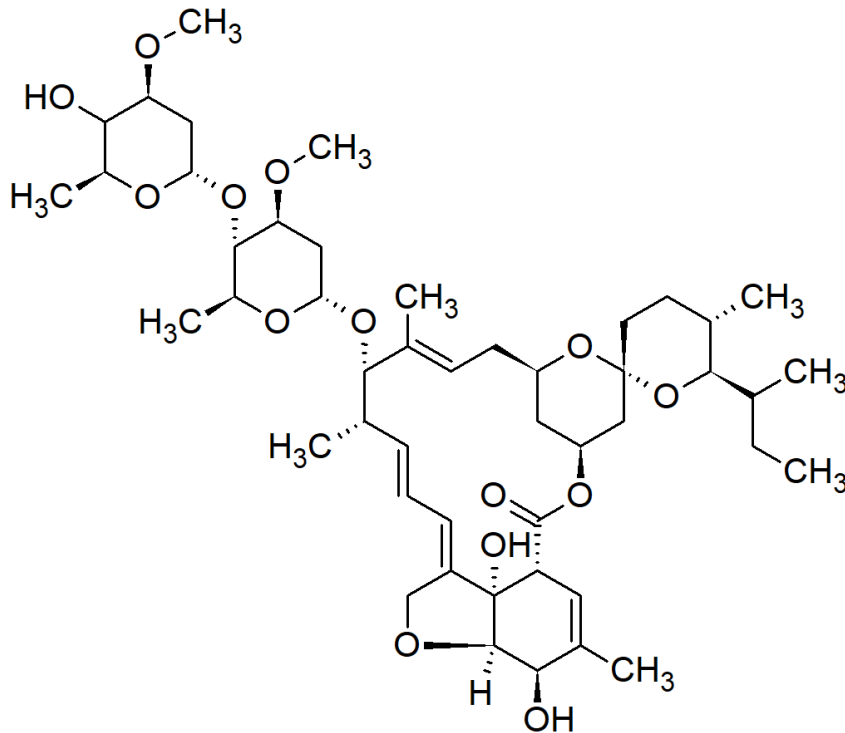


Obrázek 1. Albendazol, zdroj: Autor práce

Ivermektin byl historicky první makrocyclický lakton vyvinutý pro užití u zvířat a byl revolucí v antiparazitické terapii. Jedná se o 22, 23 – dihydroderivát avermektinu (který je fermentačním produktem *Streptomyces avermitilis*) a skládá se ze dvou složek: B_{1a} a B_{1b}. V současnosti nadále patří mezi nejvýznamnější makrocyclické laktony a zároveň veterinární léčiva (Maddison et al., 2008).

Maximální biologické dostupnosti je u IVM dosaženo po subkutánním podání, dále po perorálním podání, nejnižší hodnoty biodostupnosti jsou po podání lokálním. Díky lipofilní povaze je dobře distribuován do všech tkání a má tendenci se hromadit.

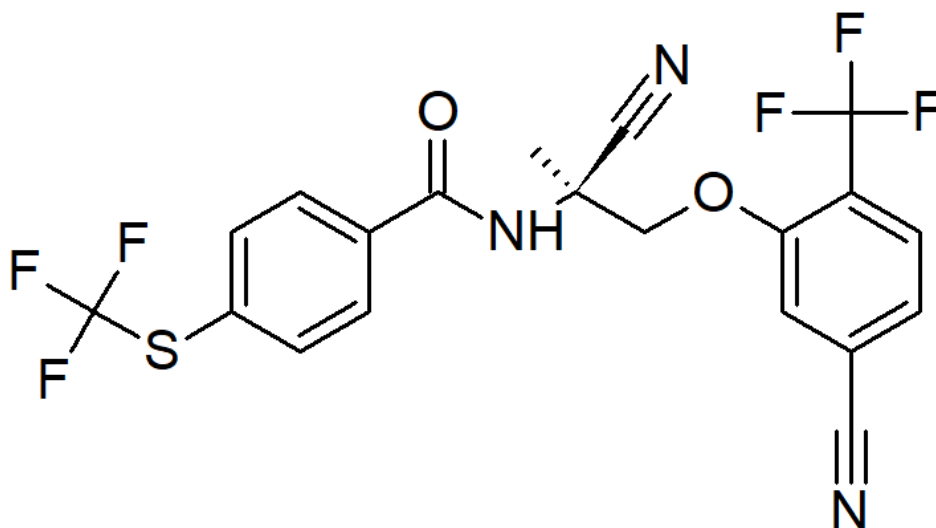
Největších hladin dosahuje v játrech a tukové tkáni, díky tomu je umožněno reziduální antiparazitické působení. Lipofilní povaha brání distribuci do centrální nervové soustavy savců, což snižuje toxicitu. Metabolizován je pouze částečně v játrech oxidačními cestami. Vylučování IVM je z velké části (98-99 %) trusem v nezměněné podobě, zbytkově je vylučován močí (SPC Ivermix).



Obrázek 2. Ivermektin, zdroj: Autor práce

Monepantel (MOP) je prvním a jediným zástupcem nových anthelmintik ze skupiny derivátů aminoacetonitrilu. Účinkuje jako pozitivní alosterický modulátor podjednotky ACR-23 nikotinového acetylcholinového receptoru. Objevení ACR-23 vedlo k hledání dalších homologních proteinů. Studie následně identifikovali jako hlavní cíl působení MOP protein Hco-MPTL-1. Účinek MOP na podjednotku vede k otevření a brání uzavření kanálů, to způsobí nekontrolovaný tok iontů a dochází k depolarizaci svalových buněk. Vzniká hyperkontrakce svalů vedoucí k spastické paralýze a následuje smrt parazita. Spektrum účinku zahrnuje i parazity rezistentní vůči více anthelmintikům (benzimidazoly, levamisol, morantel, makrocyclické laktony), tento fakt dokazuje odlišnost mechanismu účinku MOP od klasických anthelmintik (Lecová et al., 2014).

Po perorálním podání se MOP rychle vstřebává a oxiduje na sulfonový metabolit s podobnou účinností jako mateřská látka. Vylučování je především trusem a částečně i močí. Léčivo je dobře snášeno a vyznačuje se nízkou toxicitou pro savce, díky aktivitě na podjednotku, které je specifická pro nematoda (SPC Zolvix).



Obrázek 3. Monepantel, zdroj: Autor práce

2.3 Anthelmintická rezistence

Za anthelmintickou rezistencí se považuje stav, kdy anthelmintické léčivo nedokáže zabít exponovanou populaci parazitů pomocí dávky, která je terapeuticky doporučena (Dyary, 2015).

Jako hlavní příčina rozvoje rezistence se uvádí rozsáhlé užívání anthelmintik (Dyary, 2015), mezi další příčiny patří poddávkování a užívání nesespecifických přípravků. Se začátkem 60. let byl na trh uveden thiabendazol, širokospektré anthelmintikum nematocidní aktivity s nízkou toxicitou. Rychlé přijetí a četné užívání u něj, a později i u dalších benzimidazolových anthelmintik, vedlo k rozšíření rezistence nematod po celém světě. Stejný průběh se později opakoval se zavedením novějších anthelmintik (imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny a makrocyclické laktony) (Kaplan, 2004).

Anthelmintická rezistence se celosvětově zvyšuje a dosáhla bodu, kdy je postižena většina zástupců stejných chemických skupin. První zprávy o výskytu multirezistentních červů (zejména druhy *H. contortus*, *T. circumcincta* a *T. colubriformis*) se poprvé objevily

na začátku 80. let (Kaplan, 2004). Dnes jsou celosvětově zaznamenány případy multirezistence, a to především na tři hlavní skupiny anthelmintik (Kaminsky et al., 2008). Přesto některé rozdíly v mechanismech účinku jednotlivých léčiv mohou znamenat zachování účinnosti, i když na jiné členy stejné skupiny byla zjištěna rezistence (Kaplan, 2004).

Vznik rezistence představuje problém v chovech zvířat, protože ohrožuje účinnost léčby parazitóz a snižuje produktivitu hospodářských zvířat (Dyary, 2015). Za nejvýznamnější problém se považuje rezistence červů parazitujících u ovcí, koz a koní (Kaminsky et al., 2008). Přestože rezistence červů zatím nedosahuje kritického stavu, je snaha se tomuto problému věnovat a vyhledávat řešení pro snížení rozvoje rezistence helmintů vůči léčivům (Kaplan, 2004).

2.3.1 Ovlivnění rezistence

Strategií omezení vzniku rezistence je vývoj nových, nejen chemických metod, hubení helmintů, rozumnější užívání dosud účinných anthelmintik a dodržování zoohygienických opatření. Mnoho nových nechemických metod je již testováno, žádné z nich ale nejsou tak účinné jako anthelmintika a nedokážou léčit život ohrožující infekce. Nicméně by se nechemické přístupy mohly aplikovat v případě mírnějších stádií onemocnění, což by mohlo přispět k zachování citlivosti organismů na anthelmintika. Ta by se poté mohla využívat jen v případě, pokud by kontrolní opatření selhala. Když se nezmění přístup k používání anthelmintik, tedy nesníží se množství spotřeby léčiv, nedojde ani ke zpomalení rozvoje rezistence a nezbydou další terapeutické možnosti v kritických stavech onemocnění (Kaplan, 2004).

Možností ovlivnění rozvoje rezistence je i vývoj léčiv s novým mechanismem účinku. Za nová anthelmintika se považují emodepid ze skupiny cyklooktadepsipeptidů, oxindolový alkaloid paraherquamid a derivát aminoacetonitrilu MOP. Díky rozdílným mechanismům účinku jsou zatím většinou účinná i proti helmintům rezistentním na klasická anthelmintika (Martin et al., 2012).

2.3.2 Mechanismus vzniku rezistence

Pochopení mechanismů vzniku rezistence v cílových organismech je důležitým krokem k ovlivnění tohoto procesu (Kaplan, 2004). Mnoho nematod má genetické vlastnosti, které podporují rozvoj anthelmintické rezistence. Mezi ně patří časté mutace, které dodávají populaci červů mimořádně vysokou genetickou rozmanitost. Studie dokazují lepší šance pro vývoj a šíření helmintů s novým genetickým uspořádáním, protože konkurenční jedinci vnímaví na léčiva jsou z hostitelského těla vyloučeni (Dyary, 2015).

Tabulka 1. Předpokládané způsoby vzniku rezistence na anthelmintika; Zdroj: Dyary, 2015

Anthelmintická skupina	Zástupci	Mechanismus účinku	Předpokládaný mechanismus rezistence
benzimidazoly	ABZ, thiabendazol	inhibice β -tubulinových	mutace v genu kódující β -tubulin izotyp 1
probenzimidazoly	febantel, oxfendazol	podjednotek	
imidazothiazoly	levamisol, tetramizol	agonistický účinek na nikotinových acetylcholinových	snížení počtu nikotin acetylcholinových receptorů nebo snížení afinity těchto receptorů
tetrahydropyrimidiny	pyrantel, morantel	receptorech	k léčivům
amino-acetonitrilové deriváty	MOP	alosterický modulátor podjednotky Hco-MPTL-1 nikotinového acetylcholinového receptoru	ztráta části ACR-23 z nadrodiny nikotinových acetylcholinových receptorů
avermektiny	IVM, abamektin	agonistický účinek	změny v P-glykoproteinu
milbemyciny	moxidektin, milbemycin oxim	na ligandem řízených chloridových kanálů	podílejícím se na exportu léčiv

2.4 Humánní a veterinární léčiva v životním prostředí

Do přírody se dostávají nejrůznější chemikálie z průmyslu, dopravy a také léčiva humánní a veterinární. Farmaceutika mohou do životního prostředí vstoupit jako mateřská sloučenina nebo jako metabolit. Léčiva a jejich metabolity v ekosystému mohou dále působit na jiné organismy, zejména na rostliny a mikroorganismy, a mohou mít nejrůznější nežádoucí účinky (Jørgensen a Halling-Sørensen, 2000). Veterinární a humánní léčiva se do životního prostředí dostávají mnoha různými cestami. Mezi ně patří uvolňování zbytků z výrobních procesů, odpady z nemocnic, domácností a hospodářských chovů. Nejčastěji dochází ke kontaminaci povrchových vod, znečištěny mohou být i půda a sediment (Heberer, 2002). Mezi minoritní cesty vstupu léčiv do ekosystému patří emise do ovzduší a likvidace nevyužitých léčivých přípravků a obalových materiálů (Boxall, 2014).

Humánní léčiva se obvykle dostávají s exkrementy do kanalizace a prochází čistícími procesy, než se dostanou do povrchových vod nebo do půdy prostřednictvím čistírenského kalu (Boxall, 2014). Díky současnému stupni regulace čištění odpadních vod se znečištění humánními léčivy považuje za menší problém (Heberer, 2002). Mezi nejužívanější humánní léčiva patří ženská kontracepce, cytotoxické a antibakteriální látky a v neposlední řadě analgetika. Rezidua těchto skupin léčiv jsou nejčastěji nalézána v životním prostředí (Boxall, 2014).

Veterinární léčiva, narozdíl od humánních, většinou neprochází žádným způsobem čištění a do ekosystému vstupují přímo. Přípravky k ošetření ryb jsou přímo uvolňovány do povrchových vod, tento proces není nijak regulován a mimo cílové organismy tak léčiva mohou ovlivňovat i další organismy v akvakultuře. Léčiva používaná k léčbě pasené zvěře se v metabolizované či nemetabolizované podobě vylučují do půdy a vod v exkrementech léčené zvěře. Při léčbě hospodářských zvířat se léčiva do prostředí dostanou i nepřímou cestou v podobě aplikace organických hnojiv (hnůj, kejda, močůvka). Riziko znečištění může představovat i uložení fekálií ve velkých jámách, kde vzniká riziko odplavení deštěm nebo vsakování do podzemních vod (Jørgensen a Halling-Sørensen, 2000). Z veterinárních léčiv jsou nejčastějšími kontaminanty antibiotika, antiparazitika, anestetika a hormony podporující růst (Boxall, 2014).

Mimo vlastní parentní látky se může připojit účinek vzniklých metabolitů a degradačních produktů, které mohou mít další neočekávané účinky. Otázkou je i možný účinek kombinací léčiv a jiných látek, které se v přírodě nacházejí (Boxall, 2014).

2.4.1 Osud léčiv v životním prostředí

Na distribuci látek mají vliv fyzikálně-chemické vlastnosti sloučeniny i vlastnosti přijímaného prostředí. Stupeň, jakým jsou látky transportovány mezi rozdílná prostředí, primárně záleží na sorpčních vlastnostech sloučenin do daných komponent (půda, voda), které jsou pro každou látku odlišné (Boxall, 2014).

V prostředí obvykle dochází k degradaci látek organismy a/nebo může docházet k abiotickým reakcím. Obecně dochází k redukci vlastního účinku látky, ale některé vznikající degradační produkty mohou být více toxické než parentní látky. Degradace se liší v závislosti na chemických, biologických a klimatických podmínkách. Pro příklad poločas IVM je v zimních podmínkách šestkrát delší než v létě, zároveň se látka degraduje rychleji v písčítých půdách než v písčito-hlinitých (Boxall, 2014).

Biologicky aktivní látky se mohou v prostředí vyskytovat na kterékoli úrovni biologické hierarchie (buňky – orgány – organismy – populace – ekosystémy – ekosféra). Výzkumy teprve začínají s identifikací konkrétních léčiv v prostředí a jejich účinkem na organismy, které jsou důležité pro rovnováhu ekosystému (Jørgensen a Halling-Sørensen, 2000). Jako priority pro studie byla vybrána léčiva, která se nejčastěji používají, a jsou tak považována i za nejvíce zastoupená v životním prostředí (Boxall, 2014). Mezi ně byl zařazen i námi studovaný IVM.

2.4.2 Koncentrace léčiv v životním prostředí

Koncentrace léčiv objevené v povrchových vodách se obvykle pohybují v nízkých hladinách, nejčastěji méně než $1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Léčiva v životním prostředí se tedy vyskytují většinou v koncentracích menších, než v kterých se dělají zkoušky bezpečnosti a účinnosti (Boxall, 2014). Před uvedením na trh jsou léčiva studována pomocí ekotoxických testů. Splnění podmínek testu však nevyklučuje negativní vliv na životní prostředí, a to z mnoha níže uvedených důvodů. Ekotoxické testy se obvykle provádějí v mnohem větších koncentracích, než v jakých se látky nakonec reálně vyskytují

v prostředí. Obvykle se jedná o krátkodobé testy, přestože výskyt léčiv v prostředí je častokrát mnohonásobně delší. Dále se testy zaměřují na úmrtnost jako koncový bod, méně známé jsou potom účinky na růst, fertilitu a chování organismu. Přestože jsou látky stavěny tak, aby ovlivňovaly zejména lidské a zvířecí receptory, účinek a případná toxicita může probíhat i na úrovni bakterií, hub a parazitů. S vývojem nových citlivých analytických technik je umožněno lepší poznání chování léčiv v životním prostředí a nalezení i velmi malé koncentrace léčiv v půdách, odpadních a povrchových vodách (Boxall, 2014).

Protože koncentrace identifikovaných farmaceutik v pitné vodě jsou hluboko pod limity, se ovlivnění lidského zdraví zdá jako nepravděpodobné. Nicméně jiné cesty možného vystavení léčivům např. absorpce z půdy do plodin, stále nejsou kvantifikovány a nelze je proto zcela vyloučit jako potenciálně toxické pro člověka (Boxall, 2014).

Nízké koncentrace léčiv by neměly způsobovat akutní toxicitu, rizikem ale může být chronická toxicita. Některé studie se zaměřují na dlouhodobou expozici nízkých dávek léčiv a bylo zaznamenáno spektrum jemných dopadů. Mezi nimi byly zaznamenány účinky na oocyty a zraní varlat, dopady na fyziologii a chování hmyzu, ovlivnění růstu vodních rostlin a některých druhů řas, rozvoj antibakteriální rezistence v půdních mikrobech a vznik nových rezistentních druhů (Boxall, 2014). Navíc se zdá, že vývoj rezistence je podporován právě nízkými koncentracemi při dlouhodobé expozici. Některé sloučeniny mohou účinkovat jako tzv. endokrinní disruptoři narušující normální funkci hormonů a poškozující hormonální rovnováhu organismů. I tento jev je často podpořen extrémně nízkými koncentracemi látek. Dalším rizikem znečišťování ekosystému léčiv je akumulace biologicky aktivních látek v produktech zemědělství, ty se poté mohou skrze potravní řetězec dostat až k člověku a obvykle neznámým způsobem ovlivňovat lidský organismus (Jørgensen a Halling-Sørensen, 2000).

2.5 Stres u rostlin

Flexibilita metabolismu rostlin jim umožňuje reagovat na změny prostředí, které se pravidelně mění s denním a ročním obdobím. Neobvyklá omezení nebo nepředvídatelné výkyvy vyvolávají v rostlinách stres, tj. změněný fyziologický stav způsobený faktory, které narušují rovnováhu v organismu (Jaleel et al., 2009). Stres v rostlinách negativně ovlivňuje růst rostlin, produktivitu, reprodukční kapacitu nebo

přežití. Příčiny stresu zahrnují velkou škálu činitelů, které lze rozdělit do dvou kategorií, a to environmentální (abiotické) nebo biologické (biotické) stresové faktory (Jaleel et al., 2009).

Mezi nejběžnější abiotické stresové faktory patří změny množství vody (sucho a záplavy), změny teplot, extrémní ozáření, nedostatky nebo nadbytky živin, vysoká slanost a změny v kyselosti půdy. Abiotické faktory také mohou zahrnovat mechanická poškození (vítr, krupobití, propady půdy) a poškození spojená s toxickými látkami (plynné znečišťující látky, těžké kovy a další xenobiotika). Abiotické stresové faktory se zřídka vyskytují samostatně, obvykle jde o komplex vzájemně účinkujících faktorů. Biotické stresy zahrnují poškození způsobená rostlinnými patogeny (bakterie, houby a viry) a býložravými zvířaty (Jaleel et al., 2009, Cramer et al., 2011).

Stres u rostlin se může projevovat mnoha způsoby, jako hromadění cizorodých látek a jejich metabolitů, změnami pH na povrchu rostlin i v pletivech, inhibicí či aktivací určitých enzymů, zvýšením obsahu fenolu a sloučenin obsahujících konjugační skupiny např. glutathionu, snížením kyseliny askorbové v listech, snížením fotosyntézy, zvýšením respirace, snížením produkce sušiny, změnami propustnosti buněčných membrán, poruchami vodního metabolismu a dalšími (Skálová a Boušová, 2011).

2.5.1 Fytotoxicita anthelmintik

Informace o toxicitě a efektu anthelmintik na rostliny jsou omezené, protože bylo provedeno pouze několik studií. Za netoxický pro životní prostředí a jeho složky, jako je půdní mikroflóra, vodní organismy a vegetace, je považován MOP a jeho metabolity (Lecová et al., 2014). Buňky zvonku okrouhloho (*Campanula rotundifolia*) inkubované s benzimidazolovými anthelmintiky (ABZ, flubendazol, febendazol) v koncentracích 10 μM nevykazovaly signifikantní změny růstu a životnosti, nepředpokládá se tedy fytotoxicita těchto anthelmintik (Stuchlíková et al., 2016). Žádný nepříznivý účinek flubendazolu a febendazolu nebyl zaznamenán ani na vodní rostlině okřehku malém (*Lemna minor*) až do nejvyšší studované koncentrace, ve které se však obvykle tato anthelmintika v přírodě nevyskytují (Wagil et al., 2015). Abamectin a IVM jako zástupci avermektinů podléhají rychlé degradaci na světlo a silně se váží na půdu a sediment, což by mohlo minimalizovat jejich dopad na životní prostředí a necílové organismy (Halley et al., 2000). Studie Iglesias et al. (2017) však odhalila poměrně

vysoké koncentrace IVM v rostlinách rostoucích v blízkosti fekálií ošetřených zvířat. Standardní test fytoxicity, pak odhalil významnou toxicitu IVM na hořčici seté (*Sinapis alba*) i při koncentraci 50 nM, která je v exkrementech snadno dosažitelná (Vokřál et al., 2019). Nově zjištěná cesta absorpce rostlinami a následně zjištěná fytoxicita demonstrují potřebu studia vlivu léčiv na ekosystém. Navíc látka nemusí být fytotoxická, může ale v rostlině docházet k její akumulaci a na pastvách se požerem dostávat do dalších organismů ve kterých už může působit toxicky.

Vliv látek na rostlinu nemusí působit zásadní viditelné změny. Účinek léčiv na rostlinu můžeme sledovat i pomocí tzv. stresových markerů, k jejich nárůstu dochází, i když nemusí na rostlinách docházet k vizuální toxicitě. Zvýšená koncentrace prolinu, jako markeru stresu, při kultivaci jitrocele (*Plantago lanceolata*) ošetřené fenbendazolem naznačuje určitý účinek léčiva a následnou ochrannou reakci rostliny a dokazuje tak vznik stresu (Raisová Stuchlíková et al., 2018).

2.6 Xenobiotika v rostlinách

Xenobiotika různého původu jsou rostlinami nejčastěji přijímány z půdy, ovzduší, vody a atmosféry, převážně listy a kořeny. Při vstupu do listů využívají průduchy nebo povrchovou voskovou kutikulu. Do kořenů vstupují ve formě vodného roztoku skrz buněčné stěny bez vrstev kutikuly. Nejčastějšími xenobiotiky jsou pesticidy, herbicidy, průmyslové a zemědělské kontaminanty, které mohou být určeny přímo pro rostlinu nebo pro jiný cílový organismus (Skálová a Boušová, 2011).

V organismech jsou xenobiotika metabolizována. Z potenciálně toxických látek vznikají hydrofilnější sloučeniny, které jsou snadněji vylučitelné. Enzymy, které metabolizují xenobiotika, ovlivňují biologickou aktivitu a chování mnoha látek. Obvykle biologickou aktivitu látek snižují. Efekt účinku léčiv pak může záviset na aktivitě metabolizujících enzymů, proto se studují metabolické dráhy veterinárních i humánních léčiv. V případě anthelmintik i samotní helminti mohou měnit vlastnosti látek a mnohdy snižovat toxicitu léčiv vyloučených do životního prostředí z cílových organismů (Matoušková et al., 2016).

Účinky jednotlivých látek závisí na několika faktorech, a to na chemické struktuře, koncentraci a délce působení, na podmínkách prostředí, enzymatické výbavě rostlin a dalších. Látky hydrofilní povahy neprojdou přes plasmatickou membránu a jsou

pro rostlinu méně nebezpečné. Buňka je schopna regulovat jejich příjem na základě hydrofilní povahy buněčných membrán. Naopak lipofilní látky samovolně přecházejí přes plasmatickou membránu a membrány organel. Mohou se akumulovat v rostlinných tkáních a zde reakcí s proteiny, nukleovými kyselinami a jinými biomolekulami ovlivňovat endogenní metabolismus buňky, což může způsobit nevratná poškození (Skálová a Boušová, 2011).

Rostliny jsou trvale vystaveny vlivu cizorodých látek z mnoha různých zdrojů, a proto mají velice dobře vyvinuté detoxikační systémy. Některé z nich jsou podobné lidským a zvířecím, ale některé jsou pro rostliny specifické. Rostliny jsou schopné xenobiotika přeměňovat na netoxické nebo méně toxické sloučeniny a skladovat je ve vakuolách a buněčných stěnách (Bártíková et al., 2015). Při dlouhodobém vystavení toxických látek si vytvořily řadu mechanismů zabraňující negativním účinkům. Nejlépe známé jsou adaptace rostlin na výskyt těžkých kovů (Skálová a Boušová, 2011).

2.6.1 Enzymy metabolizující xenobiotika

Metabolismus xenobiotik u rostlin probíhá podobně jako v živočišné říši. Biotransformace (konverze, konjugace) se zásadně neliší, vylučování metabolitů je však nahrazeno jejich uskladňováním. Během transformace dochází k připojení hydrofilních skupin (hydroxyl, karbonyl nebo karboxyl), následuje konjugace kovalentní vazbou s endogenní rostlinnou molekulou, nejčastěji se sacharidy, peptidy nebo organickými kyselinami. Dalším krokem je uskladnění ve vakuolách a buněčné stěně. Někdy bývá označována ještě čtvrtá fáze, ve které dochází k přeměnám uskladněných konjugátů. V každé fázi se uplatňují různé skupiny enzymů (Skálová a Boušová, 2011). Příklady enzymů metabolizujících xenobiotika jsou uvedeny v tabulce 2.

V živočišné říši i u rostlin jsou biotransformační enzymy a transportní proteiny indukovatelné. Expres a aktivita proteinů detoxikace je většinou vyvolána samotnými xenobiotiky jako odpověď na tzv. chemický stres (Bártíková et al., 2015).

Tabulka 2. Příklady enzymů metabolizujících xenobiotika; Zdroj: Bártíková et al., 2015

Enzymy metabolizující xenobiotika	
I. fáze biotransformace	Cytochrom P450 (CYP) Peroxidasy Alkoholdehydrogenasy Aldehyddehydrogenasy Aldo-ketoreduktasy Nitroreduktasy Karboxylesterasy Epoxid hydrolasy
II. fáze biotransformace	Glutathion-S-transferasy (GST) Glycosyltransferasy Malonyltransferasy Methyltransferasy
Transportéry	ABC transportéry MATE transportéry

2.6.1.1 Enzymy I. fáze biotransformace

Častými enzymy I. fáze biotransformace jsou hydrolasy např. karboxylových esterů a nitroesterů. Estery v přijímaných látkách jsou hydrolyzovány za vzniku sloučenin s hydrofilními skupinami (karboxylovými, hydroxylovými atd.). Na těchto reakcích se podílejí esterasy, nejčastěji ze skupiny karboxylesteras (Skálová a Boušová, 2011).

Dalšími obvykle se vyskytujícími reakcemi I.fáze jsou hydroxylace, které jsou katalyzovány skupinou enzymů oxidoreduktas. Zavedení hydroxyly může probíhat přímo na aromatickém jádře nebo na alkyly navázaném na aromátu. Reakce jsou nejčastěji katalyzovány CYP. Na oxidačních reakcích se také účastní peroxidasy, které v buňce redukují peroxid vodíku nebo jiné peroxidy za současné oxidace další sloučeniny tedy xenobiotika. Jedná se o skupinu heterogenních enzymů, které bývají často indukovány stresovými faktory a zároveň se podílejí na mnoha buněčných procesech. Oxidační reakce fenolických sloučenin katalyzují fenoloxidasy. Xenobiotika s nitroskupinu (explosivum trinitrotoluen, pesticidy, barviva) jsou přeměňovány reduktasami za vzniku derivátů s nitroso-, hydroxylamino- nebo aminoskupinou (Skálová a Boušová, 2011).

CYP, které se vyskytují ve všech žijících organismech, patří mezi nejdůležitější enzymy I. fáze biotransformace. Tvoří jednu z největších rodin rostlinných proteinů. U rostlin se vyskytuje více isoformů než u živočichů, struktura a vlastnosti jsou však podobné. Obvykle katalyzují monooxygenace, zahrnující hydroxylaci, epoxidaci, dealkylaci, dekarboxylaci a isomerizaci substrátu, ale mohou také účinkovat jako peroxidasy nebo reduktasy. Všechny tyto reakce mohou sloužit k detoxifikaci xenobiotik, ale hrají i zásadní roli v biosyntéze různých endogenních sloučenin (Bártíková et al., 2015).

2.6.1.2 Enzymy II. fáze biotransformace

Ve II. fázi biotransformace dochází ke konjugaci s endogenní molekulou, tím se zvyšuje hydrofilita xenobiotik a snižuje se jeho aktivita. U rostlin může docházet ke konjugaci se sacharidy, glutathionem, kyselinou malonovou, aminokyselinami a/nebo s polymery buněčné stěny jako jsou ligniny, celulóza a pektiny. Hlavní skupinou enzymů jsou transferasy, které katalyzují reakce, při nichž dochází k přenosu funkčních skupin mezi donorem a akceptorem (Skálová a Boušová, 2011).

Konjugace xenobiotik s glutathionem (přes jeho thiolovou skupinu) jsou katalyzovány prostřednictvím enzymů z nadrodiny GST. Podílejí se na základních funkcích pro růst a vývoj rostliny, při prevenci oxidačního poškození, účastní se endogenního metabolismu a katalytických i nekatalytických úloh při detoxikaci xenobiotik. Rostlinné GST přitahují pozornost zejména kvůli jejich roli v toleranci vůči herbicidům (Bártíková et al., 2015).

Uridindifosfát (UDP)-glykosyltransferasy (UGT) se nacházejí jak v rostlinné, tak i v živočišné říši. Zprostředkovávají přenos glykosylových zbytků na akceptorové molekuly (aglykony). Zatímco savci využívají kyselinu UDP-glukuronovou, rostlinné enzymy obvykle využívají UDP-glukosu. Nicméně i jiné sacharidy a jejich deriváty mohou být použity jako konjugační činidla. Glykosylace reguluje mnoho vlastností aglykonů např. jejich bioaktivitu, rozpustnost a transportní vlastnosti. UGT se proto jeví jako klíčové enzymy v detoxikaci různých xenobiotik např. organochlorinů z insekticidů v odpadních vodách nebo benzimidazolových anthelmintik (Bártíková et al., 2015).

U vyšších rostlin mohou být glykosidy podrobeny další transformacím např. malonylaci, která je katalyzována malonyltransferasami. Jedná se o adaptivní mechanismus specifický pro rostliny. Využíván je k detoxikaci xenobiotik a k modifikacím potřebným pro zpracování flavonoidů (Bártíková et al., 2015).

Připojení endogenní molekuly ve II. fázi biotransformace může být signálem pro transport konjugátů přes tonoplast do vakuol nebo přes plasmatickou membránu do apoplastu, kde jsou následně uskladněny (Bártíková et al., 2015).

2.6.1.3 Transportéry xenobiotik

Mnoho látek není schopno přecházet přes lipidovou membránu. Jejich transport je umožněn díky specifickým transportním proteinům tzv. transportérům. Tyto proteiny nejsou prozatím v rostlinných systémech významně studovány, přestože rostlinné genomy obsahují velké množství genů kódujících transportéry xenobiotik. Transportéry obvykle umožňují přesun širší skupině látek, zejména na základě strukturní podobnosti. Kromě transportu xenobiotik se podílejí i na transportu celé řady endogenních sloučenin včetně flavonoidů, glutathionových konjugátů a chelátorů kovů (Bártíková et al., 2015).

Mezi hlavní proteiny transportující široké spektrum organických látek patří ATP-dependentní transportéry (ABC transportéry) a MATE transportéry. Transportéry ABC patří k jedné z největších proteinových nadrodin, která se podílí na xenobiotickém metabolismu. Mimo jiné se podílí na biosyntéze chlorofylu, pohybu průduchů, růstu a vývojových procesech rostlin. Transportéry MATE se podílí na detoxikaci kovů a metabolismu fenolu. Jsou důležitou složkou udržující homeostázu, díky vylučování metabolických odpadních produktů a xenobiotik. Rostliny mimo tyto dvě hlavní skupiny obsahují velké množství netypizovaných transportérů, které se mohou podílet na detoxikaci xenobiotik a na dalších metabolických pochodech (Bártíková et al., 2015).

2.7 Rostliny použité pro studium

2.7.1 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Huseníček rolní patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jedná se o drobnou jednoletou nebo ozimou bylinu. Lodyha je přímá, 5-30 cm vysoká. Je téměř celá lysá, jen ve spodní části porostlá chlupy. Přízemní listy rostou v růžici a mají obkopinatý tvar, jsou často porostlé chlupy. Kvete od dubna do května. Květy jsou bílé, čtyřčetné v hroznovitém květenství. Plodem je šešule (Hoskovec, 2007).

Vyskytuje se jako plevel na polích, při okrajích cest, na svazích a na rumišťích. Je nenáročná a má krátkou dobu života jedné generace. Využívá se jako modelová rostlina v genetice. Má poměrně malý genom, který byl první, z rostlinné říše, kompletně nasekvenován (Hoskovec, 2007).



Obrázek 4. Huseníček rolní, Zdroj: Deyl a Skočdoplová-Deylová, 2001

2.7.2 Jetel luční (*Trifolium pratense*)

Jetel luční patří do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Jedná se vytrvalou bylinu dorůstající 20-80 cm s charakteristickým trojlístkem listů. Vytváří mohutný kořenový systém a centrální hlavní kořen může prorůstat hluboko do substrátu. Listy jsou střídavé charakteristicky trojčetné, vzácně vlivem genetické mutace mohou být čtyř- nebo vícečetné. Listy jsou celokrajné, řapíkaté nebo přisedlé, elipsoidní až vejčité s typickou bělavou skvrnou na lící straně ve tvaru V. Na rubové straně jsou jemně ochlupené. Květy jsou malé, pětičetné, narůžovělé barvy nebo červené s bílými korunními lístky. Jetel kvete od května do října. Květenství je husté a hlávkovitě uspořádané. Plodem jsou nepukavé lusky uzavřené v kalichu (Janča a Zentrich, 1995).

Rostlina původem z Evropy se postupně rozšířila do západní Asie a severozápadní Afriky. Dnes je poměrně celosvětově rozšířená. Jedná se o běžnou bylinu luk, pastvin, polí i lesů, nezávisle na nadmořské výšce (SalviaParadise, 2019). Jetel se využívá jako tradiční hospodářská rostlina zejména jako píce ke krmení hospodářských zvířat a významná je i při zúrodnování půdy. Ve včelařství se využívá jako nektarodárná bylina s vysokými hodnotami cukernatosti (SalviaParadise, 2019).

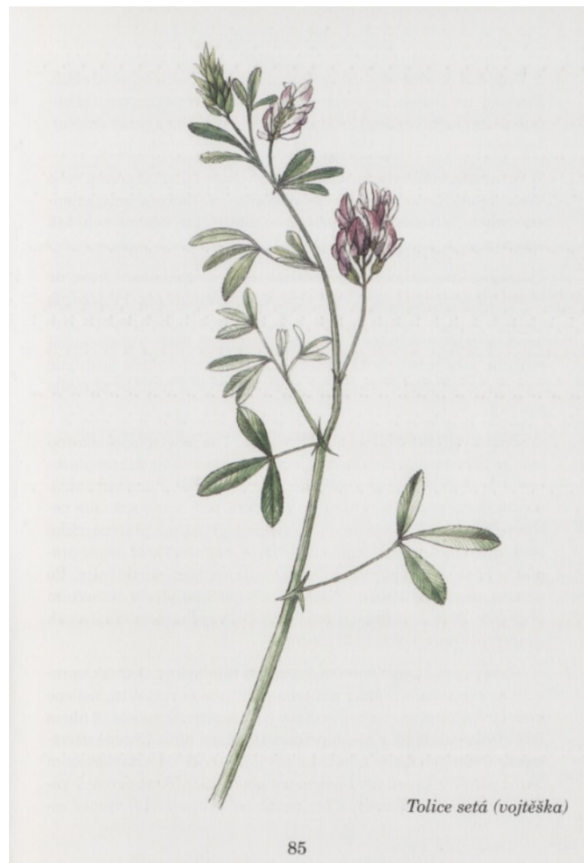


Obrázek 5. Jetel luční; Zdroj: Janča a Zentrich, 1995

2.7.3 Vojtěška setá (*Medicago sativa*)

Vojtěška neboli tollice setá patří do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Jedná se o trvalku s dřevnatým oddenkem a přímou, přes 50 cm dorůstající, lodyhou. Trojčetné listy jsou řapíkaté, obvejčité, na bázi dlouze klínovité a vpředu zubaté. Květy jsou krátce stopkaté, modrofialové, typicky motýlokvěte. Kvete od května do září. Plod je ledvinovitě nebo spirálně stočený lusk (Janča a Zentrich, 1997).

Rostlina původem z Malé a Střední Asii se využívá jako pícnina a pěstuje se v mnoha křížencích, dnes poměrně celosvětově. Roste zejména na slunných a výhřevných pláních. Velmi rozšířená je jako krmivo zejména pro skot, zvláště díky vysokému obsahu bílkovin, který zlepšuje růst svalové hmoty (SalviaParadise, 2019).



Obrázek 6. Vojtěška setá, Zdroj: Janča a Zentrich, 1997

3 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo sledování vlivu a biotransformace vybraných anthelmintik (ABZ, IVM, MOP) v pícečních rostlinách (*Trifolium pratense* a *Medicago sativa*).

Dílčí cíle byly:

- kultivace *Trifolium pratense* a *Medicago sativa* (*in vitro* a ve skleníku) s vybranými anthelmintiky
- stanovení vlivu anthelmintik na stresové markery (chlorofyl *a/b*, prolin, karotenoidy, obsah proteinů) u vybraných rostlin
- identifikace metabolitů ABZ v *Trifolium pratense* a *Medicago sativa*

4 Experimentální část

4.1 Materiál, pomůcky a přístroje

4.1.1 Chemikálie

2,2-dihydroxyindan-1,3-dion (ninhydrin) – Sigma-Aldrich, ČR

2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC) – Sigma-Aldrich, ČR

ABZ – Sigma-Aldrich, ČR

Acetonitril – Sigma-Aldrich, ČR

Amoniak – Sigma-Aldrich, ČR

Bradfordovo činidlo – Sigma-Aldrich, ČR

CaCl₂ – Penta, ČR

Destilovaná voda – ÚEB AV ČR

Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich, ČR

Doramektin – Sigma-Aldrich, ČR

Dusík (tekutý) - Linde

Ethanol – Penta, ČR

Ethylacetát – Sigma-Aldrich, ČR

Ethylendiamintetroctová kys. (EDTA) – Sigma-Aldrich, ČR

HCl – Penta, ČR

IVM – Sigma-Aldrich, ČR

K₂HPO₄ – Penta, ČR

KCl – Penta, ČR

Mebendazol – Sigma-Aldrich, ČR

Methanol – Penta, ČR

MgSO₄ – Penta, ČR

MOP – FAF UK v HK

Mravenčí kys. – Penta, ČR

NaHCO₃ – Penta, ČR

NaOH – Penta, ČR

Octová kys. – Penta, ČR

Polyoxyethylensorbitan monolaurát (Tween-20) – Sigma-Aldrich, ČR

Polyvinylpyrrolidin K 30 (PVP 40) – Sigma-Aldrich, ČR

Prolin – Sigma-Aldrich, ČR

Redestilovaná voda – FAF UK v HK

Sörensenův fosfátový pufr pH 7,5 – ÚEB AV ČR

t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) – Sigma-Aldrich, ČR

4.1.2 Pomůcky

Automatické pipety (SOCOREX Acura, Eppendorf), Erlenmeyerovy baňky, filtrační papír, hliníková folie, kádinky, kolony, kopistky, kultivační sklenice s uzávěrem, lžičky, magnetická míchadla, mikrozkušavky, nálevky, nůžky, odměrné válce, parafilm, pinzety, psací potřeby, skleněné kuličky, stříčky, špičky, vialky, zkumavky, ...

4.1.3 Přístroje

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge – Thermo Fisher Scientific, USA

Centrifuga UNIVERSAL 32R – Hettich Zentrifugen, Německo

Hmotnostní spektrometr (MS) s trojitým kvadrupólem (QqQ) – Shimadzu, Japonsko

Homogenizátor T25 basic Ultra-Turrax – IKA Labortechnik, Německo

Incubátor mikrozkušavek Thermo-Shaker TS-100 – SIA BIOSAN, Litva

Kapalinový chromatograf Nexera – Shimadzu, Japonsko

Kuličkový homogenizátor FastPrep-24 5G – MP Biomedicals, USA

Laminární box Holten Safe 1.2 – Thermo Fisher Scientific, USA

Lyofilizátor LABCONCO freezone 2,5 – ExpotechUSA, USA

Magnetická míchačka Color Squid – IKA Labortechnik, Německo

Magnetická míchačka IKAMAG RCT basic– IKA Labortechnik, Německo

Odparka Concentrator plus – Eppendorf, Německo

pH elektroda SenTix 41 – WTW, Německo

pH metr 3210 – WTW, Německo

Tecan Infinite M200 – Tecan, Švýcarsko

Tiskárna BMP 21 LAB – Brady, USA

Třepačka Multi Reax – Heildoph Instruments, Německo

Třepačka WIZARD IR Infrared Vortex Mixer – VELP Scientifica, Itálie

4.1.4 Biologický materiál

Jetel luční (*Trifolium pratense*) – semena (AROS osiva) + rostliny

Vojtěška setá (*Medicago sativa*) – semena (AROS osiva) + rostliny

4.2 Metodika

4.2.1 Kultivace vojtěšky a jetele

Vliv anthelmintik byl sledován u rostlin vojtěšky a jetele pěstovaných v *in vitro* podmínkách na MS médiu o pH 5,8. Složení média uvedeno v tabulce 3. Sterilizace semen před vysetím zahrnovala cca 1 hod promývání s kapkou Tweenu 20 za opakovaného promíchávání. Následně se semínka promývala 2 min v 70 % ethanolu, dále 6 min v 20 % Savu, a nakonec čtyřikrát 5 min sterilní vodou. Semínka byla za sterilních podmínek rozseta po cca 10 na skleničku. Kultivace probíhala v klimaboxu při stále teplotě 24 °C a se světelným režimem 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Naklíčené rostliny byly po dvou týdnech subkultivovány na MS médium doplněné příslušnými anthelmintiky v různých koncentracích (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; a 10 µM). Subkultivace probíhala v boxu s laminárním prouděním za aseptických podmínek s pomůckami sterilizovanými v parním autoklávu.

Rostliny vojtěšky a jetele ve skleníku byly pěstovány v květináčích na substrátu pro trávníky. Po šesti týdnech od vysetí se rostliny začaly ovlivňovat anthelmintiky. Zálivka 3x týdně obsahovala anthelmintika v různých koncentracích (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; a 10 µM) v ¼ Hoagland roztoku. Jako kontrola byly použity rostliny zalévané zálivkou s 10 µM DMSO. Pro stanovení metabolitu byla vyseta semínka jetele celkem do 30 květináčů na substrát pro trávníky s křemičitým pískem. Po 20 dnech bylo na substrát mezi rostliny přidáno cca 5 g trusu od ovcí léčených anthelmintiky. Odběr trusu byl 24 a 48 hod po aplikaci léku a odběry byly smíchány.



Obrázek 7. Rostliny jetele kultivované *in vitro* v klimaboxu, Zdroj: Autor práce



Obrázek 8. Rostliny jetele a vojtěšky pěstované ve skleníku, Zdroj: Autor práce

Tabulka 3. Složení MS média pro kultivaci vojtěšky a jetele *in vitro* upraveno dle Murashige a Skoog (1962).

Zásobní roztok	Složky	Koncentrace v zásobním roztoku [g/l]	Objem zásobního roztoku [ml/l]	Konečná koncentrace [mg/l]
A	NH ₄ NO ₃	82,50	20	1650,00
B	KNO ₃	95,00	20	1900,00
C	H ₃ BO ₃	1,24	5	6,20
	KH ₂ PO ₄	34,00		170,00
	KI	0,166		0,83
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,05		0,25
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,005		0,025
D	CaCl ₂ · 2H ₂ O	88,00	5	440,00
	CaCl ₂ · 6 H ₂ O	131,123		655,61
	CaCl ₂ bez vody	66,40		332,00
E	MgSO ₄ · 7H ₂ O	74,00	5	370,00
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	4,46		22,30
	Mn SO ₄ · H ₂ O	3,38		16,90
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,72		8,60
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,005		0,025
F	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4,12	10	41,20
	Na ₂ EDTA	3,72		37,30
	FeSO ₄	2,78		27,80
G (vitaminy)	Thiamin – B1	1 mg/100 ml	10	0,10
	Pyridoxin – B6	5 mg/100 ml		0,50
	Nikotinová kys.	5 mg/100 ml		0,50
	Glycin	20 mg/100 ml		2,00
Další složky	Agar		7,5 - 8,0g	7,5 - 8,0 g
	Sacharosa		30,00 g	30,00 g
	Myo-inositol		0,10 g	0,10 g

4.2.2 Kultivace buněk *Arabidopsis thaliana*

Kultury buněčných suspenzí *Arabidopsis thaliana* byly kultivovány na V4 médiu doplněném kyselinou naftalenoctovou a kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou (obě 1 mg/ l) a sacharózou (30 g/l). Bylo kultivováno 16 ml suspenze a 84 ml média

v 250 ml Erlenmayerových bučkách ve tmě, při teplotě 24 °C na horizontální třepače (130 rpm). Subkultivace probíhala každých 7 dní. Před vlastním ošetření byly buňky kultivovány 2 dny s médiem a následně byl přidán roztok s příslušným anthelmintikem v koncentrační řadě (0,01 μM; 0,1 μM; 1 μM; a 10 μM). Ke kontrolním bučkám byl přidán roztok DMSO (10 μM). Roztoky byly předem sterilizovány přes bakteriální filtr. Po pěti dnech kultivace s přidávanými roztoky byly buňky sklizeny a analyzovány.

4.2.3 Vliv anthelmintik na viabilitu buněk rostlin

Viabilita buněk byla stanovena metodou TTC. Podstatou metody jsou barevné změny v živých bučkách, které v neživých bučkách neprobíhají. V živých bučkách dochází k redukci bezbarvého TTC na červený trifenylformazán díky dehydrogenasové aktivitě mitochondriálních enzymů. Mrtvé buňky by neměly mít mitochondriální aktivitu, a proto nejsou schopné TTC redukovat na barevný produkt. Živé buňky tedy v roztoku zčervenejí a mrtvé barvu nezmění. Pro kvantifikaci testu se spektrofotometricky stanoví absorbance extraktu (Pollard et al., 1990).

Připravil se Sörensonův fosfátový pufr o pH 7,5 z roztoků Na₂HPO₄ a KH₂PO₄. Z pufru a TTC se připravil 0,8 % roztok TTC, který se uchovával ve tmě. Suspenze buněk *Arabidopsis thaliana* se kultivovaly dva dny a následně byla za sterilních podmínek do média přidána anthelmintika v koncentrační řadě (0,01; 0,1; 1; a 10 μM). Po pěti dnech kultivace byla stanovena životnost buněk. Buňky ze suspenze se odfiltrovaly přes Büchnerovu nálevku a stočily se pomocí centrifugy. Buněčný sediment se propláchl připraveným pufrem a zalil roztokem TTC. Na 1 g buněk se použilo 15 ml TTC. Vzorky se uchovávaly ve tmě po dobu 24 hod, poté se přidalo 60 ml ethanolu na 1 g buněk a vzorky se znovu uchovávaly 24 hod. Na měřicí mikrodestičky se napipetovalo 300 μl vzorku a měřila se absorbance při 485 nm. Výpočet procent inhibice a viability byl hodnocen podle rovnic Pollard et al. (1990):

$$\% \text{ inhibice} = \frac{100 - (Abs_{vzorek} * 100)}{Abs_{kontrola}}$$

$$\% \text{ viability} = \frac{Abs_{vzorek} * 100}{Abs_{kontrola}}$$

4.2.4 Vliv anthelmintik na růst klíčků vojtěšky

Vliv anthelmintik na růst klíčků byl sledován na semínkách vojtěšky na médiích s přidanými anthelmintiky. Ze zásobních roztoků solí se připravil testovací roztok o finálních koncentracích 4 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 1,5 mM NaHCO₃ a 0,15 mM KCl. Hodnota pH testovacího roztoku by se měla pohybovat v rozmezí 7,6-8,0, úprava pH se provedla 1M roztokem NaOH, příp. HCl. Na filtrační papíry připravené na velikost Petriho misek se rovnoměrně vytvořilo 25 pozic tužkou nebo vytvořením dírek. Filtrační papíry na misce se následně nasýtily 5 ml testovacího roztoku s anthelmintiky (rozpuštěnými v DMSO) v koncentracích (0,01; 0,1; 1; a 10 μM) a jako kontrola se nasýtily testovaným roztokem bez léčiv s přídavkem DMSO. Semínka se vložila na pozice a inkubovala se 72 h v temnotě při pokojové teplotě cca 24 °C.

Základním sledovaným parametrem je průměrná délka kořene. Hodnota stanovená ve vzorcích s anthelmintiky se porovná s kontrolou a vypočítá se procento inhibice (zkrácení) nebo stimulace (prodloužení) kořene. Uvádí se i počet nevyklíčených semen, ty se následně započítávají jako nulová délka kořene. Stejně se postupuje i v případě, pokud semeno vyklíčí, ale nedojde k vytvoření kořínku. Procentuální inhibice délky kořene se vypočítá podle Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů Ministerstva životního prostředí ČR (2007):

$$\% \text{ inhibice délky kořene} = \frac{\text{délka kořene v testovaném vzorku}}{\text{délka kořene v kontrole}} * 100$$

4.2.5 Stanovení kumulace prolinu v rostlinách

Obsah prolinu byl stanoven pomocí ninhydrinové metody podle Sanchez et al. (2015) a spektrofotometrického měření. Ninhydrin se široce využívá pro stanovení aminokyselin. Při neutrálním pH rozkládá primární α-aminokyseliny a reaguje za uvolnění NH₃ a za vzniku purpurového zbarvení, které má maximální absorpci při cca 570 nm. Při nízkém pH vzniklé zbarvení rychle přechází na bezbarvý derivát, protože dochází ke ztrátám aminových reziduí. Reakcí s prolinem a dalšími iminokyselinami vzniká při neutrálním pH žluto-oranžový produkt, protože se neuvolňuje cykлизovaná N-skupina. Při nízkém pH je zbarvení červené s maximální absorbancí při 520 nm.

Prolin se extrahoval za studena, smícháním 50 mg rozdrceného rostlinného materiálu s 1 ml 40 % ethanolem. Výsledná směs se přes noc extrahovala v lednici

při 4 °C, poté se stočila 5 min při 13 000 rpm. Připravila se reakční směs (1 % w/v ninhydrin, 60 % v/v kys. octová, 20 % v/v ethanol), která se chránila před světlem v tmavé krabici. Do mikrozkušavky se napipetovalo 300 µl reakční směsi a 150 µl ethanolového extraktu rostlinné tkáně nebo 40 % ethanol (slepý vzorek) nebo standardu prolinu (0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM, 0,04 mM, 0,02 mM) připraveného ředěním ze zásobního roztoku (100 mM L-prolin). Pro každý vzorek se připravily tři technické replikáty. Následně se zkumavky zahřívaly při 95 °C po dobu 20 min. Zahříváním docházelo k reakci mezi aminokyselinami a ninhydrinem za vzniku zbarvení. Vzorky se nechaly vychladnout na pokojovou teplotu a krátce se stočily 1 min při 2 500 rpm. Do jamky měřicí destičky se napipetovalo 100 µl vzorku ve třech replikátech a měřila se absorbance výsledné organické fáze při vlnové délce 520 nm. Kalibrační křivka pro kvantifikaci prolinu se sestavila pomocí koncentrační řady L-prolinu jako standardu.

Vztah mezi množstvím prolinu a odpovídající absorbancí je lineární v rozmezí koncentrací 0,5- 0,01 mM. Pro výpočet množství prolinu v extraktech se použila rovnice:

$$Prolin \text{ v } nmol/mg \text{ FW nebo v } \mu mol/g \text{ FW} = \frac{Abs_{extrakt} - blank}{slope} * \frac{Vol_{extrakt}}{Vol_{aliquot}} * \frac{1}{FW}$$

$$Prolin (\mu M/g \text{ FW}) = \frac{Abs_{extrakt} - Abs_{blank}}{slope} * \frac{Vol_{extrakt}}{Vol_{aliquot}} * \frac{1}{FW}$$

Kde $Abs_{extrakt}$ je absorbance stanovená extraktem, Abs_{blank} je absorbance 40 % ethanolu a slope (vyjádřen jako absorbance/nmol) je stanoven lineární regresí. $Vol_{extrakt}$ je celkový objem extraktu a $Vol_{aliquot}$ je objem použitý v testu. FW (vyjádřeno v mg) je množství extrahovaného rostlinného materiálu. Předpokládá se, že $Abs_{extrakt}$ je v lineárním rozsahu (Carillo a Gibon, 2011).

4.2.6 Stanovení obsahu světlosběrných pigmentů

Obsah pigmentů byl stanoven spektrofotometrickou metodou z 20 mg homogenizovaného rostlinného materiálu, který byl přes noc inkubován s 10 ml methanolu. Následně se vzorky stočily 15 min při 4 000 rpm. Na měřicí destičku se napipetovalo 200 µl vzorku a spektrofotometricky se měřila absorbance při 666, 653 a 470 nm. Každý vzorek se zpracoval ve třech technických replikátech. Metoda je založena na extrakci pigmentů z pletiva, které obsahují zejména chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a směs karotenoidů (β-karoten, xantofyl). Při těchto vlnových délkách dosahují píky

daných pigmentů svých maxim. Z naměřených hodnot absorbance se vypočítá obsah chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a celkový obsah karotenoidů podle následujících rovnic:

$$\text{Chlorofyl } a \text{ (mg/l)} = 15,65 \text{ Abs}_{666} - 7,34 \text{ Abs}_{653}$$

$$\text{Chlorofyl } b \text{ (mg/l)} = 27,05 \text{ Abs}_{653} - 11,21 \text{ Abs}_{666}$$

$$\text{Karotenoidy (mg/l)} = (1000 \text{ Abs}_{470} + 2,86 c_a - 85,9 c_b) / 245$$

Obsah chlorofylu v listech lze uvádět v jednotkách množství (mol) nebo jako hmotnost (g, mg) vztažených na jednotky plochy listu, jednotku hmotnosti čerstvé tkáně nebo sušiny, případně na jinou vztažnou veličinu (Lichtenhaler et al., 1983).

4.2.7 Extrakce proteinů z rostlinného materiálu

K fosfátovému pufru o pH 7 připravenému z 61,5 % K_2HPO_4 a 38,5 % KH_2PO_4 , který byl následně zředěn na výslednou koncentraci 50 mM, bylo dále přidáno 29,22 mg/l EDTA, 10 g/l polyvinylpyrrolidon K 30 a 5 ml/l triton-X 100. Rostlinný materiál 0,5-1 g byl zhomogenizován pod tekutým dusíkem v třecí misce s přidavkem extračního pufru (10 ml na 1 g sušiny) a byl pečlivě rozetřen. Poté byl zhomogenizovaný materiál přelit do mikrozkmavek a centrifugován po dobu 1 min při 10 000 g. Následně byl supernatant centrifugován po dobu 20 min při 14 000 g a při 4 °C. Supernatant se rozdělil do alikvotů po cca 0,5 ml a zmrazil při -80 °C.

Koncentrace proteinů byla zjištěna podle Bradfordovy metody. Kalibrační řada byla vytvořena pomocí koncentrací BSA (hovězí sérový albumin) 0,125-2,0 mg/ml. Na 96 jamkovou destičku s plochým dnem bylo napipetováno 5 μl vzorku a 250 μl Bradfordova činidla (Coomassie brilliant blue G-250). Po 10minutové inkubaci extraktu s činidlem byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Bradfordovo činidlo v kyselém prostředí tvoří s proteiny stabilní komplex s absorbancí mezi 465 a 595 nm.

4.2.8 UHPLC/MS analýza anthelmintik a jejich metabolitů v rostlinách

Navázilo se 50 mg (\pm 1 mg) rostlinné tkáně do vialek s homogenizačními kuličkami, k vzorkům se přidal 1 ml redestilované vody a 10 μl interního standartu (IS). Pro benzimidazoly (ABZ), MOP a pro kontrolní vzorky se jako IS použil mebendazol, pro IVM se použil doramektin. Následovala homogenizace vzorků v kuličkovém homogenizátoru. Cykly homogenizace se opakovaly 2-3x podle materiálu, pro kořeny se

cyklus opakoval 3x. Vzorky se přenesly do plastových nádobek, přidalo se 1,5 ml redestilované vody, 300 μ l amoniaku a 7,5 ml ethylacetátu. Následně se vzorky třepaly na třepačce 30 min, a poté stočily na centrifuze 10 min při 5 000 g. Z výsledného extraktu se postupně odpařovalo 5 ml do vialek při 30 °C.

Analýza ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) probíhala s využitím elektrosprejové ionizace (ESI) na MS s QoQ. UHPLC byla provedena na Nexera kapalinovém chromatografu s užitím kolony Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 150 \times 2,1 mm, s velikostí částic 1,8 μ m (Agilent Technologies, Německo). Za podmínek: teplota 40 °C v kolonovém prostoru, průtoková rychlost 0,4 ml/min, dávkovaný objem 1 μ l. Mobilní fáze se skládala z vody (A) a acetonitrilu (B), oboje s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Lineární gradient byl: 0 min – 15 % B, 8 min – 40 % B, 10 min – 95 % B, následováno 1 min isokratické eluce. Pro MS byly nastaveny tyto parametry: napětí na kapiláře 4,5 kV, teplotní blok 400 °C, teplota desolvatace 250 °C, průtok dusíku 12 l/min (sušící plyn) a průtok nebulizačního plynu 2,5 l/min. Izolační šířka dostupného rozsahu $\Delta m/z$ 2 a kolizní energie 20 eV (zjištěno jako optimální energie pro fragmentaci iontů studovaných metabolitů) s použitím argonu jako kolizního plynu pro MS/MS experimenty. Metabolity byly identifikovány na základě přítomnosti charakteristických protonových molekul $[M+H]^+$ a iontových spekter. Veškeré měření probíhalo v ESI pozitivním módu, tento mód poskytuje lepší citlivost pro studované metabolity. Relativní retence byla vztažena na metabolit mebendazolu jako IS (Stuchlíková Raisová et al., 2017).

Pro IVM analýzu byla průtoková rychlost 0,3 ml/min, mobilní fáze složena z 0,5 mM octanu amonného upraveného na pH 6,5 (A) a acetonitrilu (B). Lineární gradient byl: 0 min – 15 % B, 15 min – 95 % B, 17 min – 95 % B, následováno 1 min isokratické eluce. Pro QqQ hmotnostní spektrometr byla ESI hmotnostní spektra zaznamenávána v rozmezí m/z 50-1000 v pozitivním iontovém módu. Pro stanovení relativního píku byl jako IS použit doramektinu (Syslová et al., 2019).

Analýzu vzorků na UHPLC/MS prováděla RNDR. Lucie Raisová-Stuchlíková, Ph. D na Katedře biochemických věd, Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové. Vzorky MOP a IVM byly připraveny pro budoucí analýzu metabolitů.

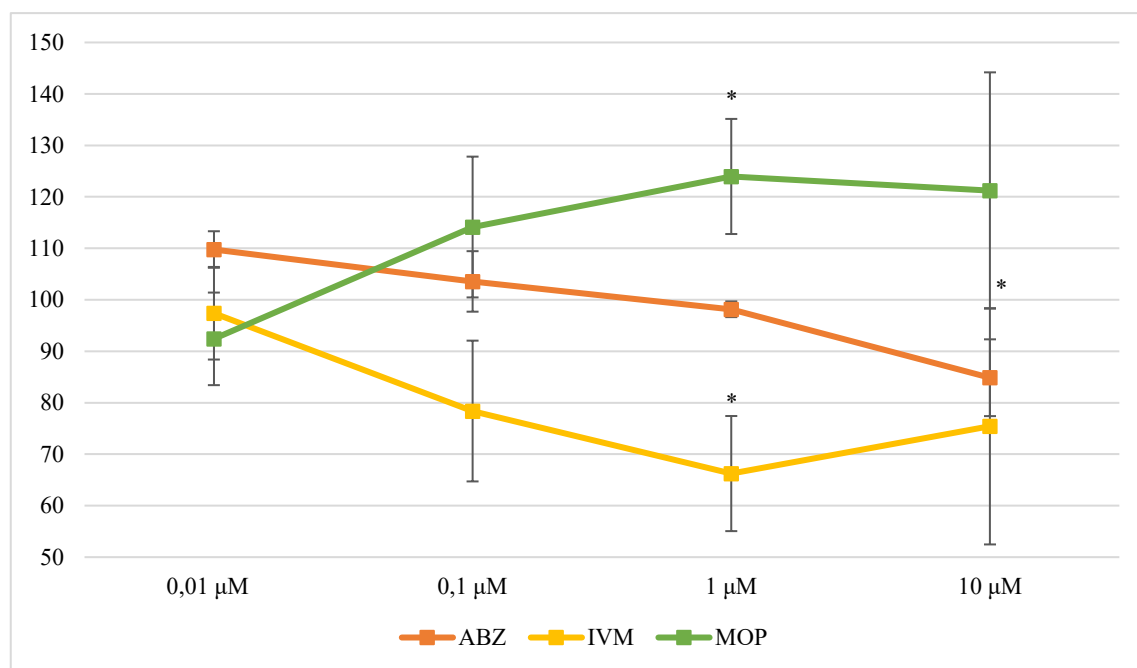
4.2.9 Statistické hodnocení

Výsledky byly hodnoceny užitím testu Anova. Každé ošetření bylo reprezentováno minimálně třemi replikáty. Rozdíly byly analyzovány s $P < 0,05$ jako hladina významnosti. Signifikantně významné výsledky jsou označeny hvězdičkou (*).

5 Výsledky

5.1 Vliv anthelmintik na viabilitu a proliferaci buněk

Test na buňkách *Arabidopsis thaliana* po pěti dnech kultivace s koncentrační řadou anthelmintik (0,01; 0,1; 1; a 10 μM) naznačuje mírné snížení počtu živých buněk po aplikaci IVM ve všech koncentracích a po aplikaci nejvyšší 10 μM koncentrace ABZ. Po aplikaci MOP byla naopak zjištěna mírná stimulace proliferace buněk zejména v koncentraci 1 μM .

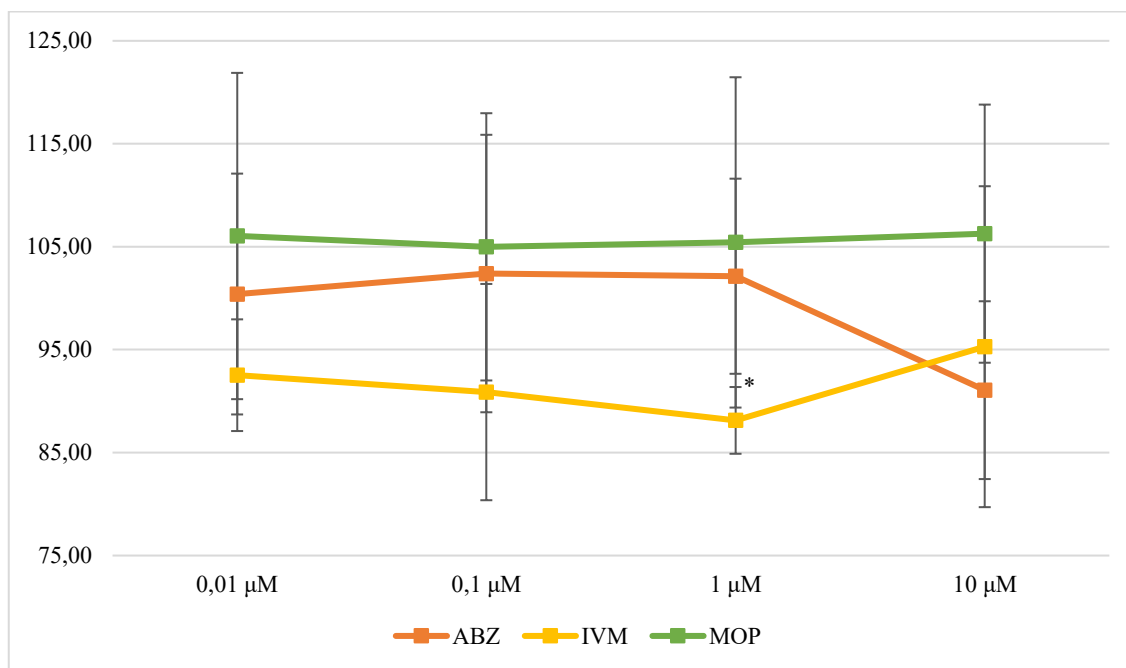


Obrázek 9. Vliv anthelmintik na životnost *Arabidopsis thaliana* v % vůči kontrole (= 100 %). Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.

5.2 Testování fytotoxicity anthelmintik

Sledování klíčivosti probíhalo na semínkách *Medicago sativa* po čtyřech dnech kultivace s koncentrační řadou anthelmintik (0,01; 0,1; 1; a 10 μM). Hodnocení akutní toxicity daných anthelmintik bylo na základě poměru délky naklíčených rostlin v přítomnosti anthelmintika vůči délce naklíčených rostlin bez anthelmintika (kontrola, 100 %).

Výsledky testů ukazují, že daná anthelmintika významně nesnižují klíčení a růst klíčků. Mírnou toxicitu lze vidět po aplikaci IVM ve všech koncentracích a po aplikaci nejvyšší 10 μM koncentrace ABZ. Žádný vliv na klíčivost a růst klíčků nebyl pozorována po aplikaci MOP.



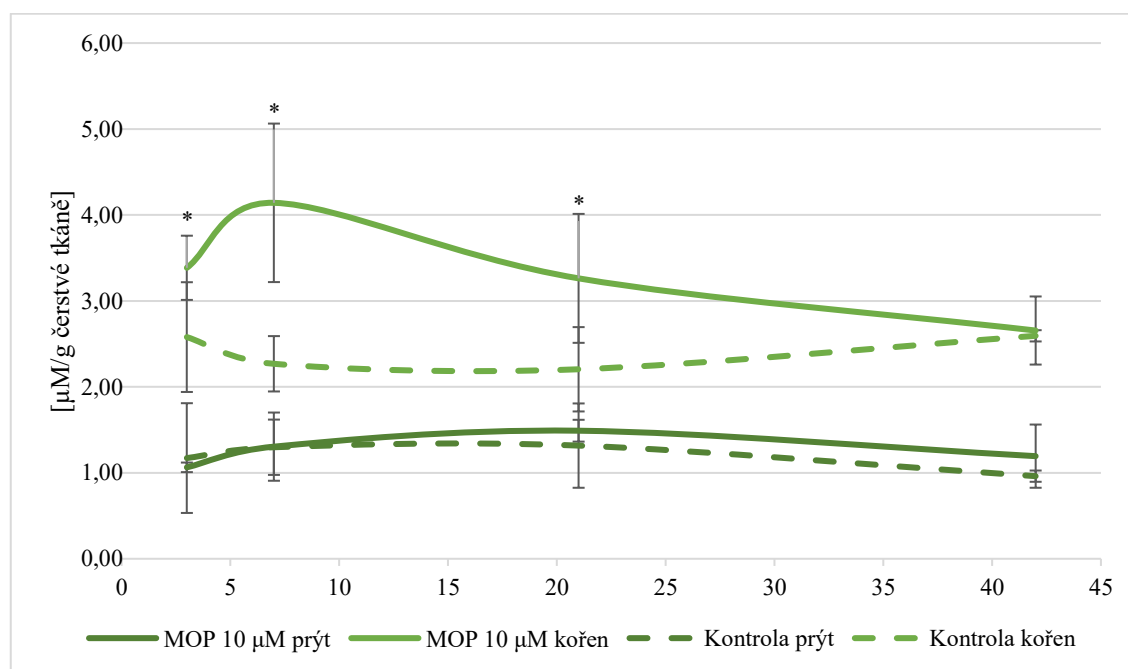
Obrázek 10. Vliv akutní toxicity anthelmintik na semínka *Medicago sativa* v % inhibice. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.

5.3 Vliv anthelmintik na kumulaci prolinu

Měření obsahu prolinu probíhalo na rostlinách *Medicago sativa* pěstovaných v *in vitro* podmínkách po 6 týdnech kultivace s koncentrační řadou anthelmintik (0,01; 0,1; 1; a 10 μM). Hodnocení množství prolinu probíhalo v nadzemní části rostliny a v kořenech v porovnání vůči kontrolním rostlinám kultivovaným s DMSO.

Po aplikaci ABZ nižších koncentrací jsme pozorovali mírné zvýšení akumulace prolinu zejména v prýtech (135 %), naopak při aplikaci vyšších koncentrací (1 a 10 μM) jsme pozorovali snížení obsahu prolinu zejména v kořenech (70 %). Opačný trend lze pozorovat po aplikaci IVM, kdy jsme při nižších koncentracích pozorovali snížení akumulace prolinu v kořenech (70 %) a ve vyšší koncentraci (10 μM) došlo k mírnému zvýšení obsahu prolinu v obou studovaných částech rostliny.

Časová závislost kumulace prolinu byla testována také na rostlinách *Medicago sativa* inkubovaných s 10 μM MOP po 3, 7, 14, 21 a 42 dnech *in vitro* kultivace. Porovnávány byly vůči kontrolním rostlinám, které byly kultivovány s DMSO. V kořenech byla zaznamenána zvýšená akumulace prolinu, nejvyšší po 7 dnech kultivace, která v čase klesala k hodnotám kontrolních vzorků.

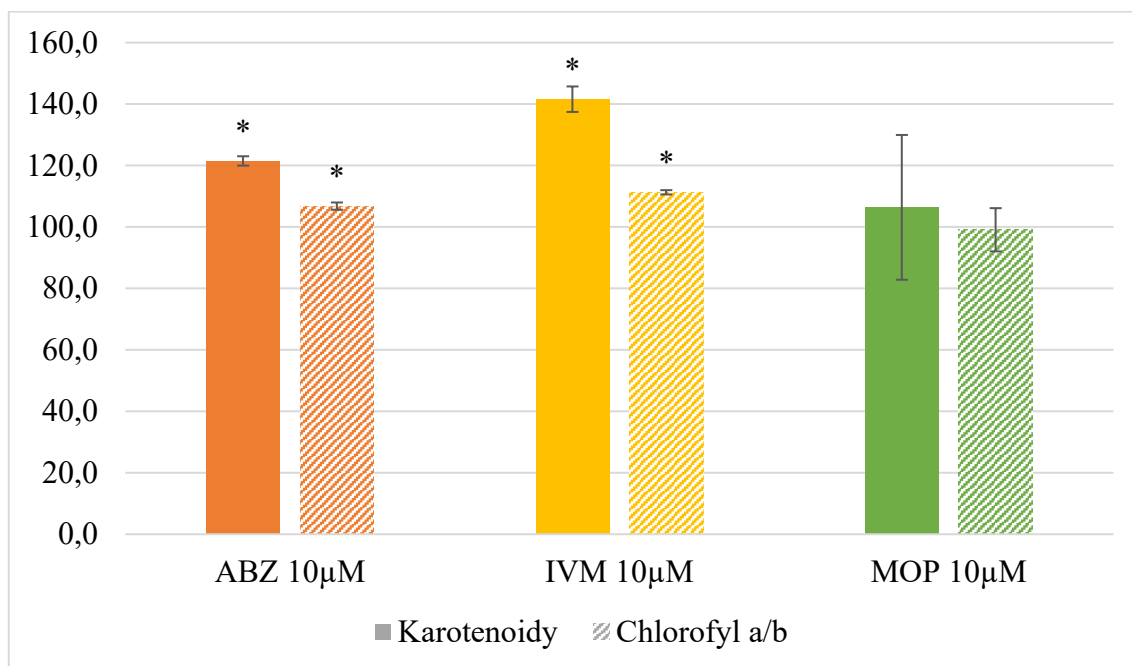


Obrázek 11. Časová závislost vlivu MOP na akumulaci prolinu v $\mu\text{M/g}$ čerstvé tkáni v rostlinách *Medicago sativa* kultivovaných v *in vitro* podmínkách. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.

5.4 Vliv anthelmintik na obsah pigmentů

Hodnocení celkového obsahu karotenoidů a chlorofylu *a/b* probíhalo na rostlinách vojtěšky i jetele pěstovaných ve skleníků po dobu 3,5 týdne. Rostliny byly zalévány koncentrační řadou anthelmintik. Na rostlinách jetele lze pozorovat mírné snížení obsahu celkových karotenoidů při aplikaci nižších koncentrací (0,1 a 0,01 μM) ABZ a (1 a 0,1 μM) IVM. Po aplikaci MOP nebyla pozorována změna. Chlorofyl *a/b* zůstal bez odezvy po aplikaci koncentrační řady všech anthelmintik. Opačnou tendenci, lze sledovat na rostlinách vojtěšky. Kde celkový obsah karotenoidů zůstal bez odezvy. Mírné zvýšení poměru chlorofyl *a/b* lze pozorovat po aplikaci nízkých koncentrací (0,1 a 0,01 μM) ABZ a při vystavení rostlin nejvyšší koncentraci IVM (10 μM).

Na rostlinách vojtěšky probíhalo i hodnocení v *in vitro* podmínkách po 6 týdnech kultivace s ABZ a IVM v nejvyšší koncentraci (10 μ M) a s koncentrační řadou (0,01; 0,1; 1; a 10 μ M) MOP. V nejvyšší koncentraci vykazovaly rostliny zvýšení obsahu karotenoidů i poměru chlorofylu *a/b* po aplikaci IVM a mírný vzestup po aplikaci ABZ. Po aplikaci MOP nebyla pozorována změna oproti kontrolním rostlinám v žádné ze sledovaných koncentrací.

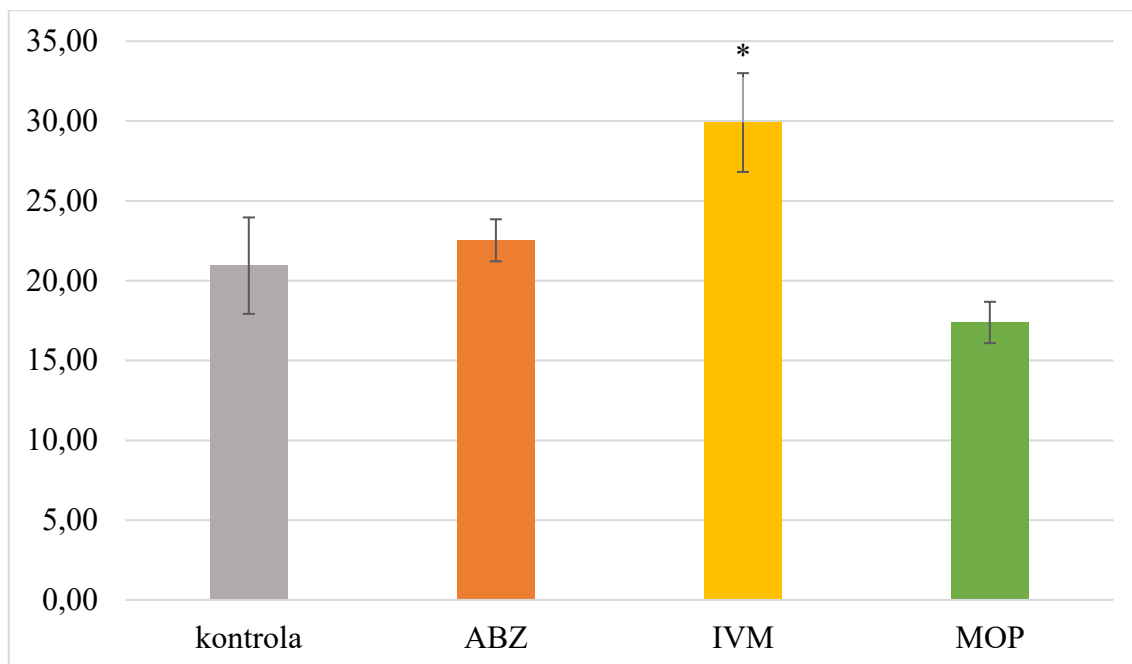


Obrázek 12. Vliv nejvyšší koncentrace (10 μ M) anthelmintik na obsah pigmentů v rostlinách *Medicago sativa* kultivovaných v *in vitro* podmínkách po 6 týdnech v % vůči kontrole (= 100 %). Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.

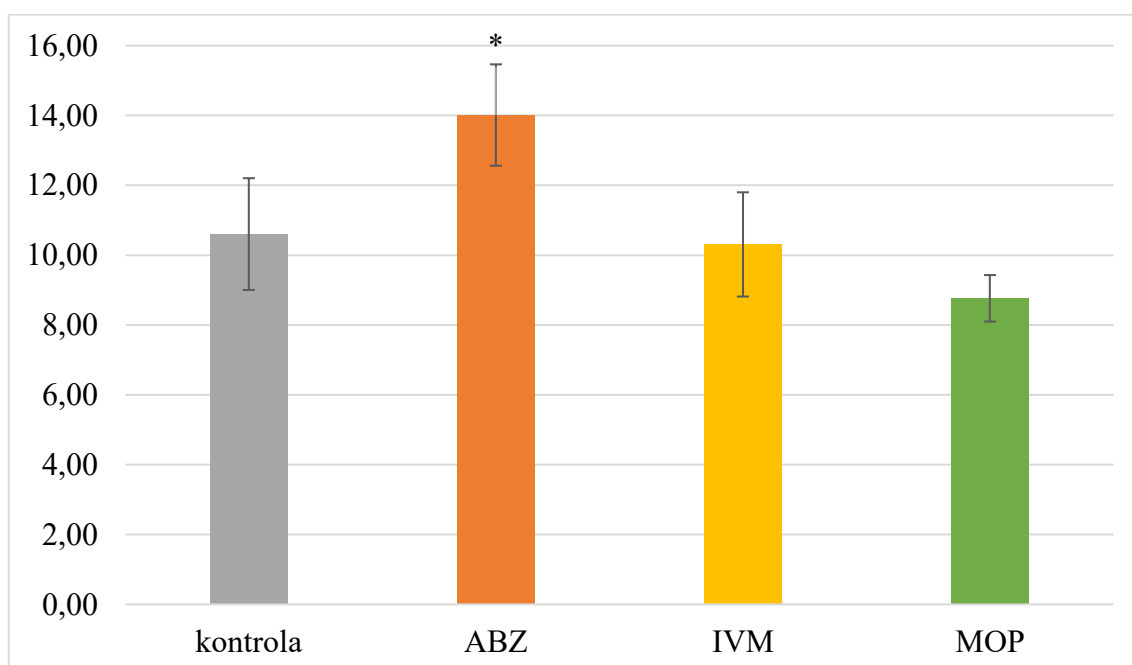
5.5 Stanovení vlivu anthelmintik na celkový obsah proteinů

Stanovení celkového obsahu proteinů probíhalo na rostlinách vojtěšky a jetele pěstovaných ve skleníku po 1 týdnu od zahájení aplikace anthelmintik v nejvyšší koncentraci (10 μ M). Kontrolní rostliny se zalévaly zálivkou s DMSO.

Na rostlinách vojtěšky se vliv IVM projevil zvýšením množství proteinů v nadzemní části. Naopak po aplikaci ABZ se zvýšilo množství proteinu v kořenech. U MOP nebyla sledována žádná změna oproti kontrolním rostlinám.

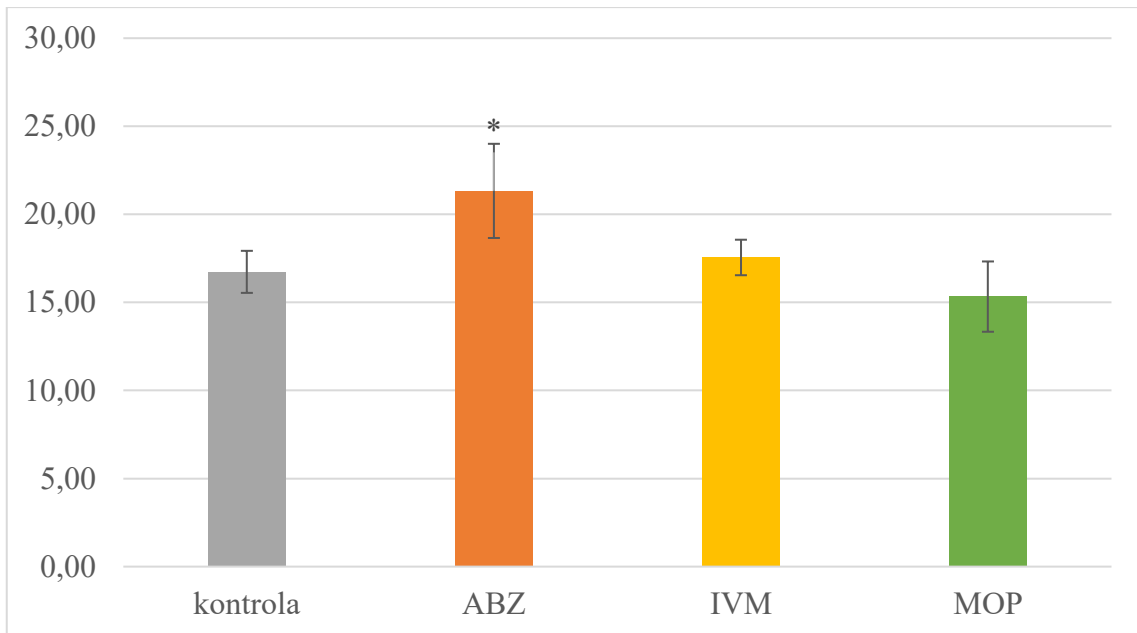


Obrázek 13. Obsah proteinu v mg/g čerstvé tkáně v listech rostlin *Medicago sativa* pěstovaných ve skleníku po 1 týdnu od zahájení aplikace anthelmintik v koncentraci 10 μ M. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.

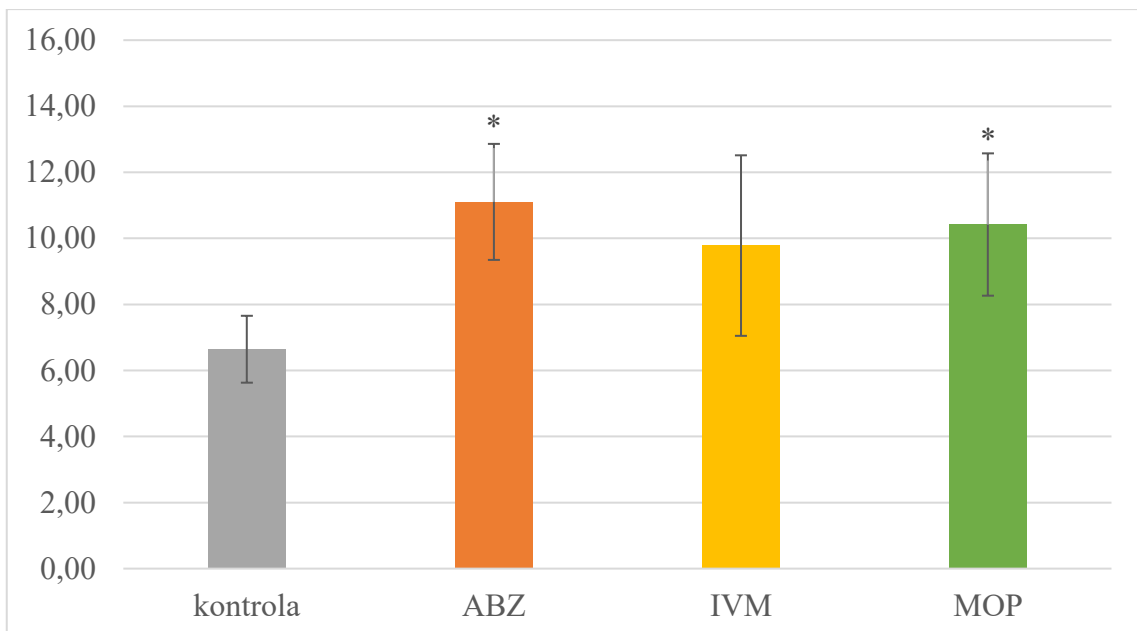


Obrázek 14. Obsah proteinu v mg/g čerstvé tkáně v kořenech rostlin *Medicago sativa* pěstovaných ve skleníku po 1 týdnu od zahájení aplikace anthelmintik v koncentraci 10 μ M. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.

Rostliny jetele reagovaly mírným zvýšením obsahu proteinů pouze v kořenech, a to po aplikaci všech anthelmintik zejména ABZ a MOP. Nadzemní části zůstaly bez odezvy pouze s velmi malým zvýšením obsahu proteinu po aplikaci ABZ.



Obrázek 15. Obsah proteinu v mg/g čerstvé tkáně v listech rostlin *Trifolium pratense* pěstovaných ve skleníku po 1 týdnu od zahájení aplikace anthelmintik v koncentraci 10 μ M. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.



Obrázek 16. Obsah proteinu v mg/g čerstvé tkáně v kořenech rostlin *Trifolium pratense* pěstovaných ve skleníku po 1 týdnu od zahájení aplikace anthelmintik v koncentraci 10 μ M. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou.

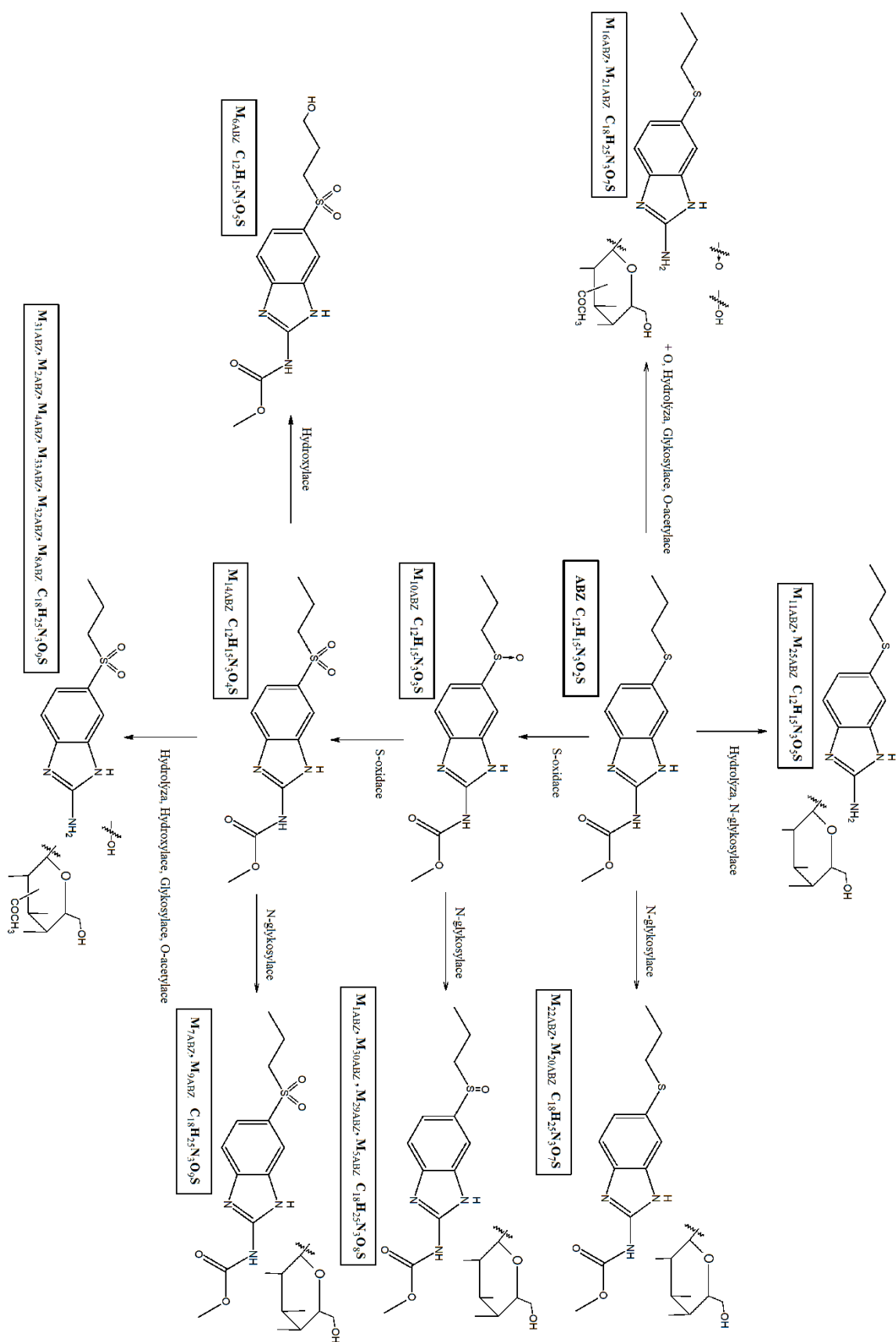
5.6 Sledování metabolismu ABZ v rostlinách

5.6.1 Stanovení metabolitů ABZ ve vojtěšce

Metabolity ABZ byly identifikovány ve vojtěšce pěstované v *in vitro* podmínkách po 6 týdnech kultivace s koncentrační řadou anthelmintika (0,01; 0,1; 1; a 10 μM). V nadzemních částech bylo celkem identifikováno 21 metabolitů a v kořenech 13 metabolitů. Nejvíce zastoupeným metabolitem byl při všech koncentracích v obou částech rostlin ABZ sulfoxid (M10_{ABZ}). V nadzemní části byly identifikovány 3 nové metabolity, u kterých docházelo k O-acetylaci (M31_{ABZ}, M32_{ABZ}, M33_{ABZ}). Schéma metabolických drah ABZ probíhajících ve vojtěšce je uvedeno v obrázku 17.

Tabulka 4. Zastoupení identifikovaných metabolitů ABZ, seřazeno podle retenčních časů, v nadzemní části a kořenu *Medicago sativa* kultivovaných v *in vitro* podmínkách s koncentrační řadou anthelmintika. Tučně vyznačen nejvíce zastoupený metabolit.

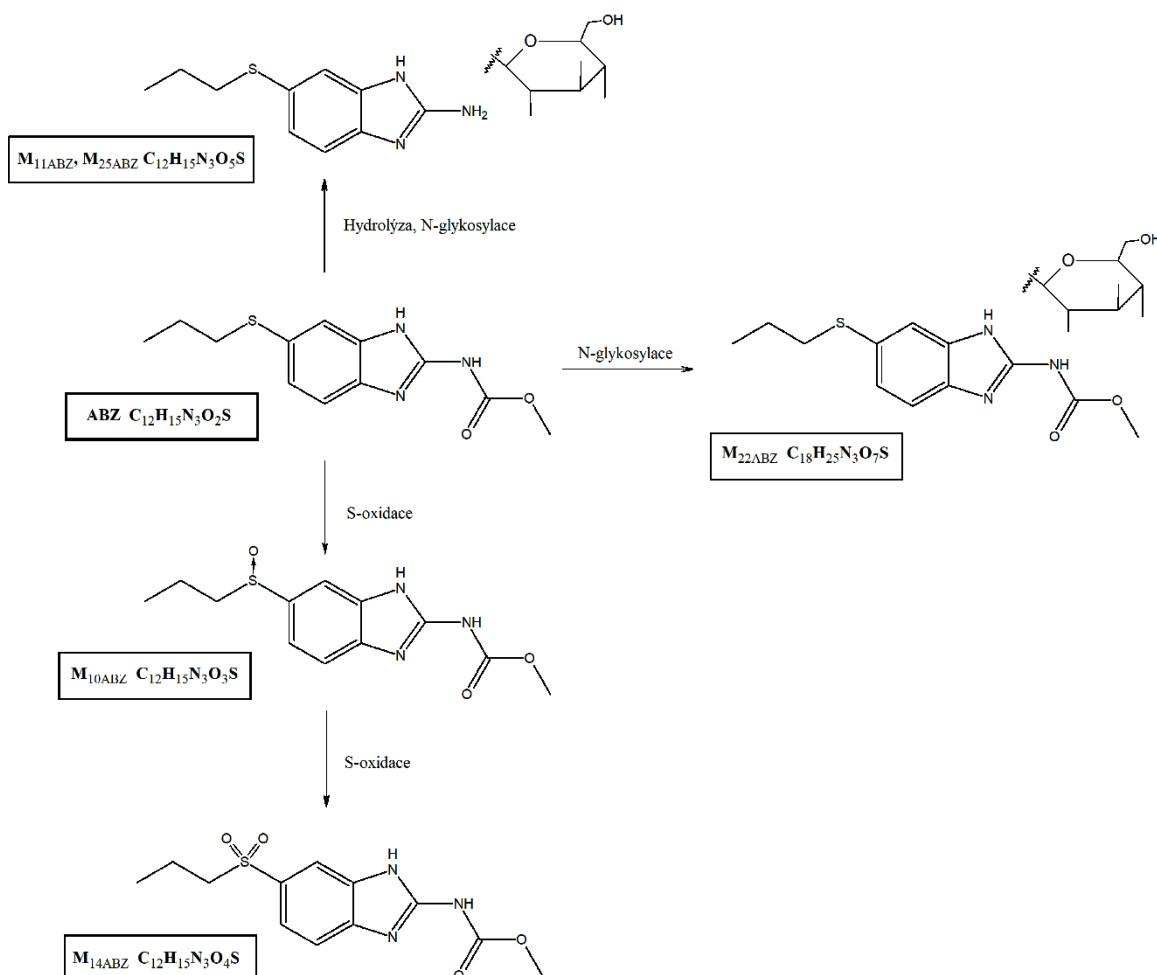
Kořen <i>Medicago sativa</i>				List <i>Medicago sativa</i>			
10 μM	1 μM	0,1 μM	0,01 μM	10 μM	1 μM	0,1 μM	0,01 μM
M1	M1			M1	M25		M25
M30							
M29				M29			
M31				M31			
M4				M4			
M32							
M7				M7			
M9				M9			
M25							
M21							
M5							
M2				M2			
M33							
M8	M8	M8		M8			
M11				M11	M11		M11
M16							
M20							
M22							
M10	M10	M10	M10	M10	M10	M10	M10
M14	M14	M14	M14	M14	M14	M14	M14
M6				M6			



Obrázek 17. Schéma metabolických drah ABZ v rostlinách *Medicago sativa* kultivovaných 6 týdnů s anthelmintikem.

5.6.2 Stanovení metabolitů ABZ v jeteli

Stanovení metabolitů ABZ v jeteli probíhalo na rostlinách po přidání trusu od ovcí léčených příslušným anthelmintikem. Odběry byly 4, 10, 27 a 51 dní od přidání trusu. V prvním a druhém odběru (4 a 10 dnů) byly identifikovány 3 metabolity, ve třetím odběru 5 metabolitů a ve čtvrtém odběru 6 metabolitů. V I. fázi biotransformace S-oxidací vzniká nejvíce zastoupený metabolit ABZ sulfoxid (M_{10ABZ}), který podstupuje druhou S-oxidací za vzniku ABZ sulfonu (M_{14ABZ}). Hydrolyzou v I. fázi a ve II. fázi N-glykosylací vznikají M_{34ABZ} , M_{25ABZ} , M_{35ABZ} . Metabolity M_{34ABZ} a M_{35ABZ} jsou nově identifikovány. V posledním odběru (51 dní) byl nejvíce zastoupen N-glykosid ABZ (M_{25ABZ}). Schéma metabolických drah ABZ probíhajících v jeteli je uvedeno v obrázku 18.



Obrázek 18. Schéma metabolických drah ABZ v rostlinách *Trifolium pratense* pěstovaných ve skleníku s trusem ovcí léčených anthelmintikem.

6 Diskuse

Veterinární léčiva se dlouhodobě vyskytují v životním prostředí. Nicméně jejich vliv na životní prostředí se začal zkoumat až v posledních letech. Již byl prokázán významný vliv nejčastěji užívaných antibiotik a hormonů na vývoj rostlin a jejich fyziologické procesy. Vliv ostatních skupin veterinárních léčiv na ekosystém byl zkoumán méně (Bártíková et al., 2016). Proto jsme se rozhodli věnovat se osudu veterinárních anthelmintik v rostlinách.

Pro studium byla vybrána tyto anthelmintika: ABZ jako typický zástupce benzimidazolových anthelmintik, IVM jako zástupce makrocyclických laktonů a MOP, který se řadí mezi nejnovější antiparazitické látky. Jako studované rostliny byly vybrány vojtěška setá (*Medicago sativa*) a jetel luční (*Trifolium pratense*). Jedná o typické luční pícniny, které se vyskytují na pastvách a mohou tak přicházet do styku s anthelmintiky z léčených zvířat. Rostliny následně mohou být zvěří požírány a léčiva se tak mohou znovu dostávat do organismu zvířat. Cílem práce bylo sledování vlivu anthelmintik na vybrané rostliny, případné odhalení fytotoxicity a získání informací o biotransformaci anthelmintik v pícninách.

Dříve provedené studie s ABZ, fenbendazolem a flubendazolem nepotvrdily akutní toxicitu na buňkách zvonku okrouhlostého (*Campanula rotundifolia*) (Stuchlíková et al., 2016). Žádné změny na klíčení semenek pšenice seté (*Triticum aestivum*) nebyly zaznamenány ani při kultivaci s paracetamolem (An et al., 2009). Nicméně IVM vykazoval inhibici klíčení semen a růstu kořínků hořčice bílé (*Sinapis alba*) již v koncentraci 50nM (Vokřál et al., 2019). V naší studii na semínkách vojtěšky byla zaznamenána signifikantní koncentračně závislá toxicita IVM a toxicita nejvyšší koncentrace ABZ, zatímco aplikace MOP zůstala bez odezvy. Stejný trend lze sledovat i na viabilitě suspenzních buněk *Arabidopsis thaliana*, kde MOP dokonce vykazoval mírnou stimulaci proliferace buněk. MOP i jeho metabolity jsou obecně považovány za netoxické pro životní prostředí (Lecová et al., 2014).

Při expozici stresu dochází u rostlin ke změnám metabolismu a kumulaci ochranných metabolitů např. aminokyseliny prolinu. Z mnoha dat vyplývá souvislost mezi kumulací prolinu a působením stresu na rostliny. Pro rostlinu je prolin v období stresu vysoce benefiční, neboť zastává tři důležité funkce: působí jako chelátor kovů, antioxidant a signální molekula. Navíc udržováním buněčného tlaku a osmotické

rovnováhy zvyšuje toleranci rostlin vůči stresu (Hayat et al., 2014). Protože se množství prolinu při stresu v rostlině zvyšuje, stanovení obsahu této aminokyseliny může být užitečné pro posouzení míry stresu u rostlin. V rostlinných tkáních se prolin obvykle pohybuje v rozmezí od 0,5 $\mu\text{mol/g}$ (bez stresu) do 50 (stres) $\mu\text{mol/g}$ čerstvé hmotnosti (Carillo a Gibon, 2011). Akumulace prolinu je sledována zejména jako odpověď rostlin na environmentální stresové faktory. Zaznamenána byla ve vojtěšce při deficitu vody (Molero et al., 2019), po vystavení chladu (Zhou et al., 2018) i při zasolení půdy (Xiong et al., 2018).

Na vojtěšce a jeteli byl obsah prolinu hodnocen po 6 týdnech kultivace s anthelmintiky a nebylo zaznamenáno tak výrazné zvýšení množství prolinu jako ve studii Raisové Stuchlíkové et al. (2018) při kultivaci jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*) s fenbendazolem, kdy byl zaznamenán signifikantní nárůst koncentrace prolinu po týdnech kultivace. Při inkubaci jitrocele s flubendazolem byl po 1 týdnu kultivace pozorován snížený obsah a po 6 týdnech zvýšený obsah prolinu. Z toho se dá usuzovat, že pro hodnocení by bylo vhodnější provádět odběry ve více časových intervalech. Stejně jako v případě kultivace MOP s vojtěškou, kdy bylo zaznamenáno významné zvýšení akumulace prolinu v kořenové části po 1 týdnu kultivace. S délkou inkubace však docházelo ke snižování koncentrace prolinu až na hodnoty rovné kontrolním rostlinám. Naopak v listové části s časem docházelo k mírnému navyšování množství prolinu. Zdá se tedy, že akumulace prolinu je nejen časově závislá, ale liší se i v jednotlivých částech rostliny. Zdá se, že kořeny reagují v první fázi kontaktu s MOP. Poté, co je MOP s metabolity transportován do nadzemních částí, dochází k navození stresu a tím ke zvýšení obsahu prolinu i v této části rostliny.

Ke změnám světlosběrných pigmentů v rostlinách dochází důsledkem vystavení stresu. Na rozdílné stresové faktory reagují však jednotlivé rostlinné druhy odlišným způsobem. Při vystavení rostlin toxickým látkám dochází ke zvýšení světlosběrných pigmentů (chlorofylů a karotenoidů), pravděpodobně za účelem zvýšení ochrany rostliny před reaktivními radikály. Naopak při suchu a jiných fyzikálních stresových faktorech obvykle dochází ke snížení obsahu chlorofylu.

Hlavní rolí chlorofylů je absorpce záření pro fotosyntézu, stejnou úlohu zastávají i karotenoidy. Ty mají několik dalších funkcí, mezi které patří např. protektivní reakce proti oxidativnímu poškození. Singletový kyslík, produkt chloroplastů při stresových

podmínkách, je velmi efektivně vázán β -karotenem. Rychlost reakce vazby je vyšší než při vazbě $^1\text{O}_2$ na biologicky důležité nenasycené mastné kyseliny. Vazba na β -karoten vede ke vzniku oxidativních produktů. Některé z nich jsou biologicky aktivní a mohou indukovat změny v genové expresi vedoucí k přizpůsobení na stresové podmínky (Havaux, 2014). I nízké koncentrace karotenoidů tedy efektivně brání lipidové membrány před reakcí singletového kyslíku a následnou peroxidací (Larson, 1988).

U pšenice bylo pozorováno zvýšení karotenoidů po aplikaci gemfibrozilu a β -estradiolu. Studie na okurce (*Cucumis sativus*) nenalezly žádný rozdíl v koncentraci karotenoidů u rostlin pěstovaných v půdě kontaminované karbamazepinem nebo verapamilem oproti kontrolním rostlinám (Osma et al., 2018). Na pšenici po vystavení paracetamolu bylo zaznamenáno snížení obsahu chlorofylu (An et al., 2009), stejně jako při vystavení zasolení (Ashraf a Harris, 2013). U vojtěšky byly snížené koncentrace chlorofylu zaznamenány při vystavení zasolení (Ashraf a Harris, 2013; Xiong et al., 2018) po vystavení chladu (Zhou et al., 2018) a při alkalizaci půdy (Liu et al., 2018).

Při suchu dochází k výraznějšímu snížení množství chlorofylu *b* než chlorofylu *a*. Tento jev pak vede ke zvýšení poměru chlorofylu *a/b*, což bylo zaznamenáno u rostlin čeledi Brassicaceae (Ashraf a Harris, 2013), u slunečnice a borůvky (*Vaccinium myrtillus*). Nicméně bylo pozorováno i snížení tohoto poměru např. na rostlinách bavlny (*Gossypium hirsutum*) a *Catharanthus roseus* (Jaleel et al., 2009).

V naší studii stanovení celkového obsahu karotenoidů a poměru chlorofylu *a/b* probíhalo na rostlinách vojtěšky i jetele pěstovaných ve skleníků a kultivovaných *in vitro*. Během pěstování rostlin ve skleníku došlo ke znehodnocení mnoha rostlin zaschnutím a napadením plísněmi, proto byl pokus předčasně ukončen (po 3,5 týdnech). Pro sběr a analýzu se použily jen rostliny, které plísní zasaženy nebyly a nebyly viditelně zaschnuté. U jetele nebyla zaznamenána žádná změna v obsahu karotenoidů ani v poměru chlorofylu *a/b*, která by mohla souviset s aplikací anthelmintik. U vojtěšky bylo zaznamenáno mírné zvýšení poměru chlorofylu *a/b* po aplikaci nejvyšší koncentrace IVM. Stejný trend byl pozorován i na rostlinách kultivovaných v *in vitro* podmínkách, kde bylo navíc pozorováno i zvýšení obsahu karotenoidů. Tyto výsledky by mohly naznačovat redukcii chlorofylu *b* a aktivaci antioxidačního systému, jako důsledek kombinace stresujících vlivů.

Stresové proteiny, jsou skupinou proteinů, které se syntetizují při zvýšené expozici buněk na různé stresující faktory, a které mají protektivní účinek proti těmto faktorům. Zvýšený obsah proteinů může indikovat zvýšenou expresi a zapojení antioxidantních enzymů, které v rostlinách detoxifikují vzniklé volné radikály (El-Shabrawi, 2010). Největší reakce se předpokládá v první fázi kontaktu se stresovými faktory, které zahrnují i léčiva. Z tohoto důvodu stanovení celkového obsahu proteinů probíhalo 1 týden po prvním vystavení rostlin anthelmintikům. Nejvýraznější odezva po aplikaci anthelmintik byla pozorována u IVM, který zvyšoval celkové množství proteinů v nadzemní části vojtěšky. V jeteli pak byl zaznamenán mírný nárůst celkového obsahu proteinů v kořenech, nadzemní části zůstaly bez odezvy. Což by mohlo napovídat efektivní indukci antioxidantního systému.

Ve studii Zhang a Shi (2018) osmotický stres u vojtěšky zvyšoval mnoho různých proteinů regulujících odpověď na stres. Studie An et al. (2009) potvrdila zvýšenou syntézu proteinů v časném stádiu expozice pšenice paracetamolem, podobné výsledky byly zaznamenány i na jiných rostlinách s odlišnými kontaminanty. Jedná se pravděpodobně o stresovou reakci rostlin, která může vést k abnormální sekreci hormonů nebo k indukci stresových proteinů. Nicméně prodloužením expozice se kapacita syntézy postupně omezuje. Studie také naznačila vyšší citlivost k paracetamolu u kořenů oproti nadzemním částem rostliny.

V druhé části naší studie jsme se zabývali metabolismem ABZ v jeteli a vojtěšce. Rostliny jsou schopné xenobiotika z prostředí vylučovat a detoxifikovat je složitým systémem enzymů, přeměnou na netoxické nebo alespoň méně toxické látky. Chrání tak sami sebe a zároveň své okolí zejména bezobratlé živočichy a býložravá zvířata. Některé druhy se proto využívají k fytoremediaci (Bártíková et al., 2015). Nejen z tohoto důvodu je vhodné znát metabolické dráhy jednotlivých farmaceutik v rostlinách.

K identifikaci metabolitů anthelmintik v jeteli a vojtěšce jsme využili kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). LC-MS je v současnosti nejrozšířenější analytický nástroj pro studium metabolismu léčiv z biologického materiálu. Hlavními důvody je rychlost, selektivita a citlivost analýzy, které byly v posledních letech výrazně zvýšeny. Před vlastní analýzou je důležitá správná úprava testovaného vzorku, protože biologické matrice jsou velmi komplexní a obsahují různé endogenní látky. Úprava obvykle zahrnuje homogenizaci, deproteinizaci a extrakci.

Důležitý je také výběr IS a optimalizace podmínek analýzy. Za účelem zakoncentrování vzorku se provádí vypařování výsledného vzorku do sucha a následná rekonstituce v malém objemu LC-MS rozpouštědla (Rousu, 2012).

V naší studii bylo identifikováno celkem 6 metabolitů ABZ v jetele po jeho kultivaci s trusem léčených ovcí a 21 metabolitů ABZ ve vojtěšce pěstované v *in vitro* podmínkách. Hlavním metabolitem byl produkt S-oxidace ABZ sulfoxid, který částečně podléhá druhé S-oxidaci za vzniku ABZ sulfonu. Hlavní reakcí I. fáze biotransformace ABZ je u všech dosud zkoumaných rostlin S-oxidace. Ve všech rostlinách mimo rákosu, je hydrolyza další reakcí I. fáze biotransformace ABZ. Hydroxylace ABZ byla zjištěna ve všech druzích rostlin kromě jetele. Ve II. fázi metabolismu podstupuje ABZ N-glykosylaci, vzniklé metabolity jsou často finální u jetele, kdežto ve vojtěšce, zvonku i jitroceli mohou podstupovat následnou O-acetylaci (Podlipná et al., 2013; Stuchlíková et al., 2016; Stuchlíková Raisová et al., 2017). To naznačuje, že O-acetylace xenobiotik je poměrně častou cestou detoxikace v rostlinách, přestože o enzymech katalyzující O-acetylaci nebyly známy žádné informace (Bártíková et al., 2015). Pouze v rákosu byly nalezeny atypické metabolity (ABZ glukosylglukosidy, a ABZ xylosylglukosidy).

V předešlé studii byl sledován metabolismus anthelmintik flubendazolu a ABZ v rákosu (*Phragmites australis*), který se často využívá ve fyto-remediačních metodách. Bylo identifikováno 5 metabolitů flubendazolu a 10 metabolitů ABZ, z nichž se většina dá považovat za biologicky neaktivní (Podlipná et al., 2013). V buňkách zvonku bylo po inkubaci s anthelmintiky identifikováno 24 metabolitů ABZ, 18 metabolitů flubendazolu a 29 metabolitů fenbendazolu. Většinou se jedná o deaktivující produkty, ale několik metabolitů zůstává biologicky aktivní. Část vznikajících metabolitů je nestabilní a může být zpět rozložena na parentní látku (Stuchlíková et al., 2016). Biotransformace flubendazolu a fenbendazolu byla sledována také na rostlinách jitrocele. Identifikováno bylo 12 metabolitů flubendazolu a 22 metabolitů fenbendazolu. Některé metabolity flubendazolu byly pozorovány i v předchozích studiích na rákosu a zvonku (Stuchlíková Raisová et al., 2018). Ve studii Stuchlíkové Raisové et al. (2017) se studovala biotransformace ABZ v jitroceli a bylo identifikováno celkem 18 metabolitů ABZ.

Z 15 metabolitů ABZ ve vojtěšce byla již většina detekována v předešlých studiích ve zvonku nebo v jitroceli. V naší studii ve vojtěšce byly identifikovány 3 nové

metabolity (M31_{ABZ}, M32_{ABZ} a M33_{ABZ}), v jeteli byly nalezeny 2 nové metabolity (M34_{ABZ} a M35_{ABZ}).

Oproti předešlým studiím, kde byly rostliny pěstovány v médiu s anthelmintikem nebo vystaveny zálivce s anthelmintikem o definované a relativně vysoké koncentraci (5 μ M nebo 10 μ M), v naší studii byly rostliny jetele pěstovány v substrátu hnojeném trusem ovcí léčených příslušným anthelmintikem, což může vysvětlovat nižší množství nalezených metabolitů oproti ostatním druhům rostlin. Rozdílné bylo i množství metabolitů nalezených ve vojtěšce při kultivaci rostlin s rozdílnou koncentrací anthelmintika. Rozdílný počet metabolitů byl nalezen i v jednotlivých tkáních. Největší počet metabolitů (21) byl zaznamenán v kořenech při kultivaci s nejvyšší koncentrací ABZ. Výrazně nižší počty metabolitů byly identifikovány při nižších koncentracích. Při nejvyšší koncentraci bylo v listu zaznamenáno 12 vznikajících metabolitů. I v jitroceli byly zaznamenány odlišné metabolity v různých tkáních. V kořenech a bazální části listů bylo identifikováno 15 stejných metabolitů, ale v horní části listu byl detekován pouze jeden z nich, spolu s dalšími dvěma odlišnými metabolity. Zdá se proto, že exprese a aktivita enzymů metabolizujících xenobiotika je rozdílná v různých modelech a tkáních, zároveň můžeme sledovat odlišnosti u jednotlivých rostlinných druhů (Stuchlíková Raisová et al., 2017).

Nalezení ABZ a jeho metabolitů v nadzemních částech jetele, který byl hnojen trusem léčených ovcí poukazuje na výrazné riziko nežádoucí cirkulace ABZ v životním prostředí. Konzumace jetele s obsahem anthelmintik zvířaty infikovanými parazity, by mohla přispívat k rozvoji rezistence těchto parazitů. Z tohoto důvodu by zvířata léčená anthelmintiky neměla být vypouštěna na pastviny a hnůj od léčených zvířat by v žádném případě neměl být použit pro hnojení polí s pícninami.

7 Závěry

Byl sledován vliv často užívaných anthelmintik (ABZ, IVM, MOP) a biotransformace ABZ v běžně se vyskytujících pícních rostlinách (*Trifolium pratense* a *Medicago sativa*).

- Byly připraveny kultivace jetele a vojtěšky (*in vitro* a ve skleníku) s vybranými anthelmintiky a kultivace suspenzních buněk *Arabidopsis thaliana*.
- Proběhlo stanovení vlivu anthelmintik na stresové markery (chlorofyl *a/b*, prolin, karotenoidy, obsah proteinů) u vybraných rostlin.

Mírná fytotoxicita byla pozorována po aplikaci IVM a nejvyšší koncentraci ABZ. Projevila se inhibicí klíčení semen a růstu kořínků vojtěšky, stejně i snížením viability suspenzních buněk *Arabidopsis thaliana*. MOP zůstal v obou případech bez odezvy.

Kořeny vojtěšky reagovaly v první fázi kontaktu s MOP zvýšením celkového množství prolinu.

U jetele se neprojevil vliv anthelmintik na změny obsahu karotenoidů ani poměru chlorofylu *a/b*. Rostliny vojtěšky po kultivaci s IVM reagovaly zvýšením poměru chlorofylu *a/b* a celkového množství karotenoidů.

Zvýšení celkového obsahu proteinu bylo pozorováno po aplikaci IVM v nadzemní části vojtěšky a v kořenech jetele. Vliv ABZ se projevil zvýšením obsahu proteinu v kořenech obou rostlin.

- Bylo identifikováno 21 metabolitů ABZ ve vojtěšce kultivované s koncentrační řadou a 6 metabolitů ABZ v jeteli kultivovaném s trusem ošetřených ovcí. V obou rostlinách byl nejvíce zastoupeným metabolitem ABZ sulfoxid. Identifikovány byly 3 nové metabolity ve vojtěšce a 2 v jeteli.

8 Seznam zkratek

ABC transportér –ATP-dependentní transportéry

ABZ – albendazol

CYP – cytochrom P450

ESI – elektrosprejová ionizace

FC činidlo – Folin-Ciocalteuovo činidlo

GST – glutathion-S-transferasa

IS – interní standard

IVM – ivermektin

LC – kapalinová chromatografie

LC-MS – kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

MATE – multidrug and toxin extrusion protein

MOP – monepantel

MS – hmotnostní spektrometrie

QqQ – trojitý kvadrupól

TTC – 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu

UDP – uridindifosfát

UGT – uridindifosfát glykosyltransferasa

UHPLC-MS/MS – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií

9 Seznam použité literatury

AINSWORTH, Elizabeth A a Kelly M GILLESPIE. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2007, 2(4), 875-877.

Aktuálně registrované VLP. ÚSTAV PRO STÁTNÍ KONTROLU VETERINÁRNÍCH BIOPREPARÁTŮ A LÉČIV [online]. 22 Květen 2019 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp>

Alfalfa - Vojtěška - *Medicago sativa* - *Salvia* ParadiseShop. *SalviaParadise Shop - Léčivé byliny, kapsle, masti, extrakty, semena a živé rostliny*. [online]. Copyright © 2019 [cit. 18.07.2019]. Dostupné z: https://www.salviaparadise.cz/herbar-rostlin-alfalfa-vojteska-medicago-sativa-c-736_764.html

AMZAD HOSSAIN, M. a Muhammad Dawood SHAH. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, 8(1), 66-71.

AN, Jing, Qixing Zhou, Fuhong Sun a Lei Zhang. Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 169(1-3), 751-757.

ASHRAF, M. a P. J. C. HARRIS. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*. 2013, 51(2), 163-190.

BÁRTÍKOVÁ, Hana, Lenka Skálová, Lucie Stuchlíková, Ivan Vokřál, Tomáš Vaněk & Radka Podlipná (2015) Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment, *Drug Metabolism Reviews*, 47:3, 374-387.

BÁRTÍKOVÁ, Hana, Radka PODLIPNÁ a Lenka SKÁLOVÁ. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*. 2016, 144, 2290-2301.

BOXALL, Alistair B A. The environmental side effects of medication. *EMBO reports*. 2004, 5(12), 1110-1116. DOI: 10.1038/sj.embor.7400307. ISSN 1469-221X.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72(1-2), 248-254.

CARILLO, Petronia & GIBON, Yves & contributors, PrometheusWiki. (2011). PROTOCOL: Extraction and determination of proline. PrometheusWiki.

CRAMER, Grant R, Kaoru Urano, Serge Delrot, Mario Pezzotti a Kazuo Shinozaki. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*. 2011, 11(1).

DEYL, Miloš, SKOČDOPOLOVÁ-DEYLOVÁ, Blanka, ed. Naše květiny. Ilustroval Květoslav HÍSEK. Praha: Academia, 2001. ISBN 802-00-0940-x.

DYARY, Hiewa Othman. Veterinary Anthelmintics and Anthelmintic Drug Resistance. *Journal of Zankoy Sulaimani - Part A*. 2015, 18(1), 191-206.

EL-SHABRAWI, Hattem, Bhumesh Kumar, Tanushri Kaul, Malireddy K. Reddy, Sneha L. Singla-Pareek a Sudhir K. Sopory. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. *Protoplasma*. 2010, 245(1-4), 85-96.

Enejoh OS, Suleiman MM. Anthelmintics and their Application in Veterinary Medicine. *Res Med Eng Sci*. 2(3). RMES.000536. 2017.

HAVAUX, Michel. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*. 2014, 79(4), 597-606.

HAYAT, Shamsul, Qaiser HAYAT, Mohammed Nasser Alyemeni, Arif Shafi Wani, John Pichtel a Aqil Ahmad. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*. 2014, 7(11), 1456-1466.

HEBERER, Thomas. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*. 2002, 131(1-2), 5-17.

HOSKOVEC, Ladislav. Herbář: *Arabidopsis thaliana*. Botany.cz [online]. [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/arabidopsis-thaliana/>

IGLESIAS, Lucía Emilia, Carlos Saumell, Federica Sagüés, Juan Manuel Sallovitz a Adrián Luis Lifschitz. Ivermectin dissipation and movement from feces to soil under field conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2017, 53(1), 42-48.

JALEEL, C.A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, R. Somasundaram and R. Panneerselvam, 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 100–105

JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin. Ilustroval Magdalena MARTÍNKOVÁ*. Praha: Eminent, 1995. ISBN 80-85876-04-3.

JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin*. Praha: Eminent, 1997. ISBN 80-858-7632-9.

Jetel luční - *Trifolium pratense* - SalviaParadiseShop. SalviaParadise Shop - Léčivé byliny, kapsle, masti, extrakty, semena a živé rostliny. [online]. Copyright © 2019 [cit. 18.07.2019]. Dostupné z: https://www.salviaparadise.cz/herbar-rostlin-jetel-lucni-trifolium-pratense-c-736_1118.html

JØRGENSEN, Sven Erik a Bent HALLING-SØRENSEN. Drugs in the environment: a review of recent research data. *Chemosphere*. 2000, 40(7), 691-699.

KAMINSKY, Ronald, Pierre Ducray, Martin Jung, et al. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 2008, 452(7184), 176-180.

KAPLAN, Ray M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. 2004, 20(10), 477-481.

KOLPIN, Dana W. a et al. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Veterinary Parasitology*. 2002, 36(6), 1202-1211.

KÜSTER, Anette a Nicole ADLER. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2014, 369(1656).

LAMKA, Jiří a Lubomír DUCHÁČEK. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Vyd. 4., nezměn. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2790-8.

LARSON, Richard A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988, 27(4), 969-978.

LECOVÁ, L., L. Stuchlíková, L. Prchal a L. Skálová. Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology* [online]. 2014, 141(13), 1686-1698.

LICHTENTHALER, Hartmut K. a Alan R. Wellburn. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 1983, 11(5), 591-592.

LIU, Duo, Miao Liu, Xiao-Long Liu, Xian-Guo Cheng a Zheng-Wei Liang. Silicon Priming Created an Enhanced Tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Seedlings in Response to High Alkaline Stress. *Frontiers in Plant Science*. 2018, 9.

MADDISON, Jill E., Stephen W. Page a David Church. *Small animal clinical pharmacology*. 2nd ed. New York: Saunders/Elsevier, 2008.

Mark KIBBLEWHITE, 2019, Rozhovor – Kontaminace půdy: znepokojující dědictví industrializace, emeritní profesor Cranfield University UK, Evropská agentura pro životní prostředí 16.12.

MARTIN, R.J., S.K. Buxton, C. Neveu, C.L. Charvet a A.P. Robertson. Emodepside and SL0-1 potassium channels: A review. *Experimental Parasitology*. 2012, 132(1), 40-46.

MATOUŠKOVÁ, Petra, Ivan Vokřál, Jiří Lamka a Lenka Skálová. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*. 2016, 32(6), 481-491.

Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Praha: MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ ČESKÉ REPUBLIKY, 2007.
[https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/390334EFF595E8B9C1256FC000440F3C/\\$file/Z_12ekotoxicita.html](https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/390334EFF595E8B9C1256FC000440F3C/$file/Z_12ekotoxicita.html)

MODULE 2. HELMINTHS: ANTHELMINTIC RESISTANCE: DIAGNOSIS, MANAGEMENT AND PREVENTION. In: Food and Agriculture Organization [online]. 2004 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e06.pdf>

MOLERO, Gemma, Guillaume TCHERKEZ, Regina ROCA, Caroline MAUVE, Llorenç CABRERA-BOSQUET, José Luis ARAUS, Salvador NOGUÉS a Iker ARANJUELO. Do metabolic changes underpin physiological responses to water limitation in alfalfa (*Medicago sativa*) plants during a regrowth period? *Agricultural Water Management*. 2019, 212, 1-11.

MURASHIGE, Toshio a Folke SKOOG. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* [online]. 1962, 15(3), 473-497.

OSMA, Etem, Yavuz Cigir, Adcharee Karnjanapiboonwong a Todd A. Anderson. Evaluation of Selected Pharmaceuticals on Plant Stress Markers in Wheat. *International Journal of Environmental Research*. 2018, 12(2), 179-188.

PODLIPNÁ, Radka, Lenka Skálová, Helena Seidlová, et al. Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology*. 2013, 144, 216-224.

POLLARD, Jeffrey W. a John M. WALKER. *Plant cell and tissue culture*. Clifton, N.J.: Humana Press, c1990. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 6. ISBN 0-89603-161-1.

Prof. RNDr. Ivan HOLOUBEK, CSc., 2017, *Kontaminace životního prostředí a oběhové hospodářství*, profesor chemie životního prostředí MU v Brně, Česká asociace oběhového hospodářství 30.1

ROUSU, Timo. *Liquid chromatography–mass spectrometry in drug metabolism studies*. Oulu, Finland, 2012. Academic dissertation. University of Oulu, faculty of science, department of chemistry

SÁNCHEZ-MARTÍN, Javier, Jim Heald, Alison Kingston-Smith, Ana Winters, Diego Rubiales, Mariluz Sanz, Luis a. J. Mur A Elena Prats. A metabolomic study in oats (*Avena sativa*) highlights a drought tolerance mechanism based upon salicylate signalling pathways and the modulation of carbon, antioxidant and photo-oxidative metabolism. *Plant, Cell & Environment*. 2015, 38(7), 1434-1452.

SHOOP, W. a M. SOLL. Ivermectin, Abamectin and Eprinomectin. In Vercruysse, J. a Robert S. Rew, *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. New York, NY: CABI Pub., c2002.

SKÁLOVÁ, Lenka a Iva BOUŠOVÁ. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1917-0.

STUHLÍKOVÁ RAISOVÁ, Lucie, Radka Podlipná, Barbora Szotáková, Eliška Syslová a Lenka Skálová. Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017, 141, 37-42.

STUHLÍKOVÁ, Lucie, Robert Jirásko, Lenka Skálová, František Pavlík, Barbora Szotáková, Michal Holčapek, Tomáš Vaněk a Radka Podlipná. Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*). *Chemosphere*. 2016, 157, 10-17.

SYSLOVÁ, Eliška, Přemysl Landa, Martina Navrátilová, et al. Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*. 2019, 234, 528-535.

TAYLOR, M. A., R. L. Coop a Richard Wall. *Veterinary parasitology*. 3rd ed. Oxford: Blackwell, 2007. ISBN 978-1-4051-1964-1.

VOKŘÁL, Ivan, Michaela Šadibolová, Radka Podlipná, et al. Ivermectin environmental impact: Excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019, 169, 944-949.

VOKŘÁL, Ivan, Šadibolová Michaela, Podlipná Radka, et al. Ivermectin environmental impact: Excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019, 169, 944-949.

VOLF, Petr a Petr HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007. ISBN 978-80-738-7008-9.

WAGIL, Marta, Anna Białk-Bielińska, Alan Puckowski, et al. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, 22(4), 2566-2573.

WEBB, S. F. a et al. A Data Based Perspective on the Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals III — Indirect Human Exposure: A National Reconnaissance. *Pharmaceuticals in the Environment*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, 2001, 36(6), 221-230.

XIONG, Xue, Nan Liu, Yu-Qi Wei, Yi-Xian Bi, Jian-Chuan Luo, Rui-Xuan Xu, Ji-Qiong Zhou a Ying-Jun Zhang. Effects of non-uniform root zone salinity on growth, ion regulation, and antioxidant defense system in two alfalfa cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018, 132, 434-444.

ZHOU, Qiang, Dong LUO, Xutian CHAI, et al. Multiple Regulatory Networks Are Activated during Cold Stress in *Medicago sativa* L. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(10).