

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



**OVLIVNĚNÍ ANTIOXIDAČNÍHO SYSTÉMU**  
**VOJTĚŠKY SETÉ**  
**ALBENDAZOLEM V REÁLNÝCH PODMÍNKÁCH**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, PhD.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2021**

**Bc. Monika Lisoňková**

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za umožnění práce v laboratořích Katedry biochemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, za odborné vedení, podnětné rady, vyhodnocení výsledků a věnovaný čas při zpracování mé diplomové práce.

Ráda bych také poděkovala Mgr. Martině Navrátiové za provedení experimentu v reálných podmínkách, zpracování modelových rostlin a poskytnutí materiálů pro experimentální část práce.

## **PROHLÁŠENÍ**

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Monika Lisoňková

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, PhD.

Název diplomové práce: Ovlivnění antioxidantního systému vojtěšky seté albednazolem v reálných podmínkách

Anthelmintika jsou léčiva využívaná k léčbě nemocí způsobených parazitickými červy. V České republice se používají hlavně ve veterinární medicíně. Benzimidazolové anthelminitkum albendazol se používá u skotu a ovcí, během jeho biotransformace se tvoří metabolity, které se vylučují spolu s parentní látkou trusem a močí. Aplikace trusu z ošetřeného skotu na pole může ovlivnit necílové organismy vyskytující se na poli. Příkladem necílových druhů jsou zemědělské plodiny, včetně vojtěšky seté (*Medicago sativa*). Rostliny nemají schopnost eliminovat absorbované látky a jejich metabolity, proto se v nich ukládají a mohou ovlivnit antioxidantní systém rostlin.

Cílem této studie bylo sledovat účinek albendazolu na antioxidantní systém vojtěšky seté (*M. sativa*) v reálných podmínkách. Rostliny byly ovlivněny trusem ovcí ošetřených albendazolem. Subcelulární frakce byly připraveny z rostlin sklizených v roce 2019 a 2020. V těchto frakcích byly měřeny aktivity vybraných antioxidantních enzymů. U rostlin z roku 2020 byly také změřeny koncentrace fotosyntetických pigmentů (chlorofylu a karotenoidů).

V obou letech došlo k nárůstu aktivity askorbátperoxidázy, katalázy, glutathion-S-transferázy a peroxidázy u rostlin ovlivněných albendazolem. Snížená aktivita byla naměřena u superoxiddimutázy. U ovlivněných vzorků albendazolem byla signifikantně snížena koncentrace karotenoidů a zvýšil se poměr chlorofyl A/chlorofyl B a poměr chlorofylu A+B/karotenoidů.

Ze získaných výsledků vyplývá, že albendazol ovlivnil antioxidantní systém vojtěšky seté, což může mít za následek poškození rostlinných buněk oxidačním stresem.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Monika Lisoňková

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, PhD.

Title of diploma thesis: The effect of albendazole on the antioxidant system of alfalfa in real conditions

Anthelmintics are drugs used to treat diseases caused by parasitic worms. In the Czech Republic they are mainly used in veterinary medicine. Benzimidazole anthelmintic albendazole is used in cattle and sheep, during its biotransformation metabolites are formed, which are excreted together with the parent compound in faeces. Application of faeces from treated cattle to the field may affect non-target organisms, occurring in the field. An example of such organisms are agricultural crops, including alfalfa (*Medicago sativa*). Plants do not have the ability to eliminate the absorbed drugs and its metabolites, therefore they are deposited in plants and can affect the antioxidant system of plants.

The aim of this study was to monitor the effect of albendazole on the antioxidant system of alfalfa (*M. sativa*) in real conditions. Plants were affected by faeces of sheep treated with albendazole. Subcellular fractions were prepared from harvested plants in the years 2019 and 2020. The concentrations of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) were also measured in the 2020 plants.

In both years, there was an increase in the activity of ascorbate peroxidase, catalase, glutathione S-transferase and peroxidase in albendazole treated plants. The carotenoid concentration of the treated samples was significantly reduced by albendazole and the chlorophyll A/chlorophyll B ratio and the chlorophyll A+B/carotenoid ratio increased.

The obtained results show that albendazole affected the antioxidant system of alfalfa, which may result in damage of plant cells by oxidative stress.

# OBSAH

1. ÚVOD .....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Anthelmintika .....	10
2.1.1 Využití anthelmintik v terapii helmintóz .....	10
2.1.2 Benzimidazolová anthelmintika.....	11
2.1.3 Albendazol .....	12
2.1.4 Biotransformace anthelmintik v rostlinách .....	14
2.1.5 Vliv anthelmintik na životní prostředí .....	19
2.2 Oxidační stres .....	22
2.2.1 Vznik reaktivních forem kyslíku .....	24
2.2.2 Vliv ROS na buňku .....	27
2.3 Antioxidační systém rostlin .....	28
2.3.1 Antioxidační enzymy .....	28
2.3.2 Neenzymové antioxidanty .....	32
2.4 Vojtěška setá ( <i>Medicago sativa</i> ).....	34
2.4.1 Obsahové látky .....	34
2.4.2 Využití vojtěšky v zemědělství .....	35
2.4.3 Využití vojtěšky v medicíně.....	36
3. CÍLE PRÁCE .....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
4.1 Pomůcky, přístroje, chemikálie .....	38
4.1.1 Pomůcky .....	38
4.1.2 Přístroje .....	38
4.1.3 Chemikálie .....	38
4.1.4 Biologické vzorky.....	39
4.1.5 Programy .....	39
4.2 Metodika přípravy rostlinného materiálu.....	40
4.2.1 In vivo pěstování rostlin .....	40
4.2.2 Klimatické podmínky .....	40
4.2.3 Metodika sběru trusu .....	41

4.2.4	Aplikace trusu k rostlinám a vzorkování.....	41
4.3	Příprava subcelulárních frakcí .....	42
4.3.1	Extrakční roztok .....	42
4.3.2	Subcelulární frakce.....	43
4.4	Stanovení koncentrace bílkovin .....	44
4.5	Stanovení aktivity studovaných enzymů.....	44
4.5.1	Stanovení aktivity askorbátperoxidázy .....	44
4.5.2	Stanovení aktivity katalázy .....	45
4.5.3	Stanovení aktivity glutathionperoxidázy .....	47
4.5.4	Stanovení aktivity glutathionreduktázy.....	48
4.5.5	Stanovení aktivity glutathion-S-transferázy .....	49
4.5.6	Stanovení aktivity peroxidázy .....	50
4.5.7	Stanovení aktivity superoxiddismutázy.....	51
4.6	Stanovení koncentrace chlorofylů a karotenoidů .....	52
4.6.1	Extrakce do methanolu .....	52
4.6.2	Stanovení koncentrace chlorofylů a karotenoidů.....	53
5.	VÝSLEDKY .....	55
5.1	Koncentrace bílkovin .....	55
5.2	Ovlivnění aktivity antioxidantních enzymů albendazolem .....	56
5.2.1	Ovlivnění aktivity askorbátperoxidázy albendazolem.....	57
5.2.2	Ovlivnění aktivity katalázy albendazolem .....	58
5.2.3	Ovlivnění aktivity glutathionperoxidázy albendazolem .....	60
5.2.4	Ovlivnění aktivity glutathionreduktázy albendazolem.....	60
5.2.5	Ovlivnění aktivity glutathion-S-transferázy albendazolem.....	60
5.2.6	Ovlivnění aktivity peroxidázy albendazolem .....	61
5.2.7	Ovlivnění aktivity superoxiddismutázy albendazolem .....	63
5.3	Přehled aktivity antioxidantních enzymů vojtěšky v roce 2019 a 2020 .....	64
5.4	Meziroční porovnání antioxidantních enzymů vojtěšky.....	65
5.5	Koncentrace chlorofylů a karotenoidů .....	67
6.	DISKUZE .....	69
7.	ZÁVĚR.....	76
8.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	77

9. SEZNAM LITERATURY.....	78
---------------------------	----



# 1. ÚVOD

Anthelmintika jsou farmaka využívaná ve veterinární medicíně pro léčbu a prevenci helmintóz hospodářských a zájmově chovaných zvířat. Je sledován nárůst používání těchto léčiv jako důsledku udržitelného stavu hospodářství. Metabolizováním anthelmintik v těle zvířat a následným vyloučením trusem a močí, dochází ke vstupu těchto látek a jejich metabolitů do životního prostředí. I malé koncentrace parentní molekuly léčiva a metabolitů mohou mít vliv na necílové druhy, jako je vodní ekosystém, půdní bezobratlí a rostliny. Subletální dávky anthelmintik v životním prostředí mohou způsobovat vznik rezistentních kmenů parazitických červů.

Vystavování rostlin abiotickému stresu, jako jsou veterinární léčiva, je znepokojivým faktorem omezujícím růst a vývoj rostlin a také působícím na antioxidační systém enzymatický i neenzymatický.

V této studii byly rostliny vojtěšky seté (*Medicago sativa*) ovlivněny trusem ovcí léčených albendazolem. Vzhledem k tomu, že experiment probíhal v reálných podmínkách na poli, mohlo dojít k působení několika abiotických stresorů na rostlinu, tedy působení jak chemických látek představovaných albendazolem a jeho transformačními produkty, tak působení klimatických podmínek. Byly sledovány specifické aktivity vybraných antioxidačních enzymů a také ukazatelé stresu v rostlinách, konkrétně koncentrace chlorofylů a karotenoidů.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Anthelmintika

#### 2.1.1 Využití anthelmintik v terapii helmintóz

Anthelmintika jsou farmaka využívaná ve veterinární i humánní medicíně pro léčbu helmintóz. Ve veterinární medicíně nachází tyto přípravky uplatnění rovněž jako prevence pro snižování populace parazitů v tělech zvířat (*Lamka a Ducháček, 2014*). Helmintózy představují pro chovatele dobytka problém, neboť jsou limitujícím faktorem pro udržitelnou a úspěšnou produkci hospodářských zvířat (*Dyary, 2015*). Helmintózy jsou infekce způsobené parazitickými červy, patřícími do kmene ploštěnců (*Platyhelminthes*) a hlístic (*Nematoda*). Ploštěnci obsahují 3 třídy červů a to: tasemnice (*Cestoda*), motolice (*Trematoda*) a jednorodé (*Monogenea*). Kmen *Nematoda* zahrnuje několik druhů hlístic, způsobujících nematodózy. Tyto parazitární infekce patří mezi nejčastěji se vyskytující a postihují jak lidskou populaci, tak zvířata, hospodářská i zájmově chovaná (*Dyary 2015*). Anthelmintika jsou dělena dle účinku na výše zmíněné zástupce parazitických červů na: antinematoda, antitremitoda a anticestoda (*Lamka a Ducháček 2014*).

Mechanismus účinku anthelmintik je velmi rozmanitý. Anthelmintika působící proti 1 nebo 2 parazitárním červům jsou označována jako úzkospektrá, proti více druhům jako širokospektrá. Z historického hlediska byly, jako první širokospektrá anthelmintika, uvedeny na trh přípravky fenothiazin a piperazin (*Enojoh a Suleima, 2017*).

Podle schopnosti parazita zabít nebo paralyzovat, jsou anthelmintika dělena na přípravky vermicidní, tedy helminty usmrcující, a vermifugní, které jsou schopné inhibovat růst helmintů a způsobí vypuzení červa z těla hostitele (*Rock, 2007*).

Anthelmintika jsou biosyntetického nebo syntetického původu a podle chemické struktury jsou rozlišována na: benzimidazoly, imidazolthiazoly, tetrahydropyrimidiny, organofosfáty, makrocyclické laktony a aminoacetonitrilové deriváty (*Lamka a Ducháček, 2014; Enoh a Suleiman, 2017*).

Důsledkem nezbytného užívání anthelmintik, jako prostředku pro udržení přijatelného stavu hospodářství, je vzrůstající spotřeba těchto farmak. Toto s sebou nese především rizika ve formě rezistence na anthelmintika a negativní dopad na životní prostředí (Varády et al., 2011; Domke et al., 2011).

### 2.1.2 Benzimidazolová anthelmintika

Benzimidazol je heterocyklická, aromatická sloučenina, vykazující široké spektrum biologických účinků. Kromě anthelmintických účinků byly benzimidazolové sloučeniny zkoumány pro antivirotickou, protinádorovou a antibakteriální aktivitu (Antoci et al., 2020; Mavrova et al., 2006; Zhang et al., 2019). Většina benzimidazolových sloučenin jsou bílé krystalické látky, s vysokou teplotou tání. Z hlediska rozpustnosti se jedná o látky málo rozpustné ve vodě a rozpustnost se u těchto sloučenin zvyšuje, se snižujícím se pH (Riviere a Papich, 2009).

Prvním benzimidazolovým anthelmintikem uvedeným na trh byl v roce 1962 thiabendazol. Následoval vývoj dalších sloučenin vycházející z benzimidazolové struktury. Benzimidazolová anthelmintika patří mezi širokospektrá antiparazitika a jednotlivé přípravky využívané ve veterinární praxi jsou spolu s druhovou indikací uvedeny v tabulce 1 (Enoh a Suleiman, 2017). Z fyzikálně chemických vlastností vychází léčivé formy benzimidazolových anthelmintik, dostupné především jako perorální tablety, pelety, suspenze a pasty (Bodeček et al., 2017).

Mechanismus účinku benzimidazolových anthelmintik spočívá ve vazbě benzimidazolových sloučenin na  $\beta$ -tubulinové podjednotky mikrotubulů. Touto vazbou dochází k inhibici vazby  $\beta$ -tubulinu, který se za normálních okolností začleňuje do buněčných struktur, které jsou nezbytné pro energetický metabolismus parazita. Při podání benzimidazolového anthelmintika dochází k narušení polymerace tubulinových struktur, což vede k energetickému rozvratu a následuje smrt helminta (Lacey, 1990).

Metabolity parentního léčiva ze skupiny benzimidazolových anthelmintik jsou většinou produkty oxidačních a hydrolytických reakcí. Jsou polární a ve vodě rozpustné. Metabolity jsou často konjugovány s kyselinou glukuronovou, touto reakcí dochází ke zvýšení jejich polarizace, což usnadní vylučování močí a žlučí (Alvarez et al., 2000; Lanusse a Prichard 1993).

**Tabulka 1: Zástupci benzimidazolových anthelmintik**

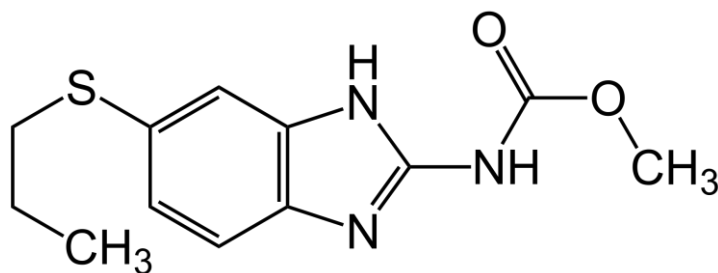
<b>Benzimidazoly</b>	<b>Léková forma</b>	<b>Spektrum účinku</b>	<b>Druhá indikace</b>
<b>Albendazol</b>	p.os. suspenze	tasemnice, střevní hlístice, jaterní motolice	skot a ovce
<b>Febantel</b>	p.os. suspenze, pasty	širokospektré	kůň, přežvýkavci, kočka, prase
<b>Fenbendazol</b>	p.os. suspenze	tasemnice, střevní hlístice, plicní helminti, měchovci	skot, ovce, koza, kůň, prase, pes
<b>Flubendazol</b>	p.os. tablety, pasty	hlístice, červi parazitující v plicích a GIT	prase, drůbež
<b>Mebendazol</b>	p.os. pasta, tablety, granule	hlístice, měchovci, tasemnice	kůň, ovce, koza, prase, pes
<b>Nitrobimin</b>	p.os. suspenze	tasemnice, jaterní motolice, plicní helminti	skot a ovce
<b>Oxfendazol</b>	p.os. suspenze	hlístice	skot, ovce, kůň
<b>Oxibendazol</b>	p.os. suspenze	hlístice (larvální stádia i dospělci)	prase, skot, ovce, kůň
<b>Thiabendazol</b>	p.os. preparáty, pasty	tasemnice, motolice	kůň, skot, ovce, kozy
<b>Ricobendazol</b>	p.os. preparáty, subkutánní injekce pro skot	tasemnice, střevní hlístice, jaterní motolice, plicní helminti	skot a ovce

### 2.1.3 Albendazol

Albendazol byl vybrán jako modelové anthelmintikum pro tuto práci. Albendazol se nejčastěji využívá jako antiparazitikum u přežvýkavců, především ovcí a skotu. Působí proti hlísticím a tasemnicím v gastrointestinálním traktu, jaterním motolicím a také proti helmintům v plicích. Albendazol lze také aplikovat při léčbě parazitárních infekcí postihující plicní parenchym zájmově chovaných zvířat (Dayan, 2003).

U koček a psů je albendazol využíván pro léčbu plicních červivostí vyvolaných parazitickými helminty třídy *Trematoda* (*Filaroides hirthi* a *Paragonimus kellicotti*) (Gyurik et al., 1981). Výhodou tohoto anthelmitika je účinnost jak proti dospělcům výše zmíněných červů, tak proti jejich vývojovým stádiím. Jedná se tedy o sloučeninu s ovocidní, vermucidní a larvicidní aktivitou (Dayan 2003).

Doporučené dávky u skotu a ovcí jsou odlišné dle druhové indikace a také se liší podle helminta, na kterého je léčba cílena. Je doporučeno následující dávkování: 5 mg/kg živé hmotnosti u ovcí pro léčbu tasemnic. Pro léčbu tasemnic u skotu se doporučuje 7,5 mg/kg a totéž dávkování pro léčbu motolic u ovcí. U skotu se dávkování pro léčbu motolic zvyšuje na 10 mg /kg. Důvodem vyšších dávek albendazolu u skotu, je vyšší metabolická oxidační kapacita tohoto zvířecího druhu oproti ovcím (Dayan 2003).



**Obrázek 1: Chemický vzorec albendazolu, převzato z wikipedie**

Po chemické stránce je albendazol [5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát (Obr.2). Po perorálním podání se ABZ metabolizuje v játrech na albendazol sulfoxid (ABZSO). Na metabolismu albendazolu se podílí mikrosomální enzymy jaterní tkáně, především flavin-monooxygenáza a cytochrom P450. Vznikající ABZSO je odpovědný za anthelmintický účinek albendazolu. ABZSO má ve své molekule chirální atom síry, což z něj dělá látku opticky aktivní. Jsou známy dva enantiomery a to (+)-ABZSO a (-)-ABZSO (Lanusse et al., 1991; Solana et al., 2001). ABZSO je dále oxidován na neaktivní derivát albendazol sulfon. Močí a žlučí jsou vylučovány ABZ, ABZSO, albendazol sulfon a také konjugáty II. fáze biotransformace, tedy konjugáty s kyselinou glukuronovou (Alvarez et al., 1999).

#### 2.1.4 Biotransformace anthelmintik v rostlinách

Všechny živé organismy mají obranné mechanismy, které je chrání před účinkem cizorodých sloučenin tzv. xenobiotik. Tyto obranné mechanismy jsou představovány biotransformačními reakcemi, bez kterých by xenobiotikum dosáhlo v organismu toxických koncentrací (Croom 2012).

Klíčovou roli v biotransformaci cizorodých látek představují enzymy metabolizující xenobiotika (XME). Enzymy jsou indukovatelné, jako odpověď na chemický stres vyvolaný přítomností xenobiotika, dochází ke zvýšení jejich exprese a aktivity (Bártíková et al., 2015).

Biotransformační enzymy jsou v rostlinách přítomny ve velkém množství izoforem. Oproti živočišným enzymům vykazují užší substrátovou specifitu (Chromá et al., 2001).

U rostlin je popsán třífázový biotransformační mechanismus xenobiotik. Fáze I. je tzv. bioaktivační fází a dochází při ní k tvorbě polárnějších, ve vodě rozpustných sloučenin. Tyto metabolity jsou poté ve II. fázi konjugovány se sacharidy, organickými kyselinami, aminokyselinami nebo glutathionem. Touto reakcí dochází ke vzniku konjugátů, které vykazují menší toxicitu než parentní xenobiotikum. Fáze III. představuje transport a uskladnění konjugátů II. fáze do buněčných struktur, nejčastěji vakuol nebo buněčné stěny (Komives a Gullner 2005; Chromá et al., 2001). V buněčných vakuolách někdy dochází k úpravě konjugátů. Této IV. fáze se účastní například enzym karboxypeptidáza, schopná odštěpit aminokyseliny z glutathionu, na kterém je metabolit xenobiotika navázán (Skálová et al., 2013).

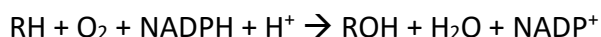
Na počátku 90. let proběhly studie, zabývající se podobností živočišných a rostlinných biotransformačních procesů cizorodých látek. V roce 1994 byl pak Sandermannem představen koncept tzv. *Green liver system*, ve kterém shrnuje, že jak rostliny, tak i živočichové jsou schopni xenobiotika metabolizovat pomocí specifických biotransformačních enzymů. A jejich společným cílem je tvorba hydrofilních sloučenin, které jsou lépe transportovatelné a dochází u nich k rychlému vyloučení. U živočichů je konečným krokem vyloučení metabolitů cizorodé látky stolicí nebo močí, u rostlin je tento krok nahrazen kompartmentací metabolitu do vakuol buňky nebo do buněčné stěny (Pflugmacher et al., 2015; Komives a Gullner 2005).

### 2.1.4.1 Fáze I.

VI. fázi dochází k oxidačním, redukčním nebo hydrolytickým reakcím. Tyto reakce mají za následek zavedení funkční skupiny do molekuly xenobiotika nebo demaskování již existujících funkčních skupin. Vznikají polární, ve vodě rozpustnější látky (Komives a Gullner 2005). Nejčastěji probíhají reakce I. fáze oxidačně (S-oxidace, N-oxidace, C-hydroxylace, N-hydroxylace) za účasti několika enzymových systémů. Největší roli v těchto reakcích mají monooxygenázy s cytochromy P450 a peroxidázy (Komives a Gullner 2005; Chromá et al., 2001).

**Cytochromy P450 (CYP)** jsou enzymy třídy oxidoreduktáz ukotvené v endoplazmatickém retikulu. Jejich podíl na biotransformačním metabolismu byl studován u mikroorganismů, rostlin, hmyzu a živočichů. U rostlin zastávají kromě role v metabolismu xenobiotik další, především biosyntetické funkce. Mají podíl na tvorbě složek buněčné stěny, mastných kyselin a hormonů (Nelson a Werck-Reichhart 2011).

CYP katalyzují následující reakci:



Na reakci, při které dochází ke štěpení O-O vazby, se spoluúčastní enzym NADPH:cytochrom P450 reduktáza, který zprostředkuje NADPH jako zdroj elektronů. Kromě oxidačních reakcí se CYP účastní také dealkylací, dehydratací a reakcí při nichž dochází ke štěpení vazby C-C (Morant et al., 2003; Pandian et al., 2020).

Dalšími hemoproteinovými enzymy katalyzující oxidační reakce I. fáze jsou peroxidázy. Byly nalezeny a popsány u bakterií, hub, rostlin a živočichů. Katalyzují oxidačně redukční reakci, při které dochází k redukci peroxidu vodíku a současně oxidaci substrátu. Peroxidázy jsou substrátově nespecifické, čemuž odpovídá velké množství izoform tohoto enzymu. Nadrodina peroxidáz se skládá z 3 tříd, v rostlinách se vyskytuje především třída I. a III. Askorbátperoxidáza se řadí do I. třídy peroxidáz a její hlavní funkcí je ochrana rostliny před oxidačním stresem. Sekreční peroxidázy patřící do III. třídy jsou to strukturně glykoproteiny, obsahující disulfidické můstky a ionty vápníku. Kromě schopnosti oxidovat cizorodou látku, hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostliny (Jouili et al., 2011; Pandey et al., 2017).

Xenobiotické a ebiotické alkoholy a aldehydy jsou oxidovány za katalýzy alkoholdehydrogenáz (ADH) a aldehyddehydrogenáz (ALDH). Na biotransformaci xenobiotik se podílí ve větší míře ALDH. U ADH nalezené v rostlinách byla popsána účast na vzniku vůní, lákajících opylující hmyz. ALDH katalyzuje reakci, při které jsou aldehydy přeměňovány na příslušné karboxylové kyseliny, reakce jsou  $\text{NAD}^+$  nebo  $\text{NADP}^+$  dependentní (*Strommer et al., 2011; Brocker et al., 2013*).

Redukční reakce představují hlavní metabolizační cestu pro xenobiotika s chemickou strukturou ketonů, chinonů, nitrosloučenin, N-oxidů nebo S-oxidů. Tyto reakce nejsou tak časté jako oxidační. Enzymy katalyzující redukční reakce jsou řazeny do nadrodin dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem a aldoketoreduktázy.

Karboxyesterázy a epoxidhydrolázy jsou enzymy katalyzující hydrolytické reakce, nejčastěji esterů, aminu a epoxidů (*Bártíková et al., 2015*).

#### **2.1.4.2 Fáze II.**

Ve II. fázi dochází ke skutečné detoxikaci, produkty I. fáze jsou konjugovány s endogenními molekulami, obsahující ionizovatelnou skupinu. Konjugáty jsou výrazně méně toxické než původní xenobiotikum nebo jeho deriváty vzniklé v I. fázi. Reakce II. fáze se nazývají konjugační a jejich produkty jsou glykosylové, aminokyselinové nebo peptidové konjugáty xenobiotika. Tyto reakce jsou závislé na dodání energie (*Komives a Gullner 200; Skálová et al., 2013*).

Důležitým enzymem II. fáze je **gluathion-S-transferáza** (GST), která katalyzuje konjugaci substrátu s glutathionem. Tato reakce zahrnuje připojení tripeptidu glutathionu na xenobiotika obsahující halogenové, fenolátové nebo alkylsulfoxidové skupiny. Dochází tedy k nukleofilním vytěšňovacím reakcím mezi elektrofilními centry cizorodých látek a glutathionovým aniontem ( $\text{GS}^-$ ), který slouží jako nukleofil. Thiolová skupina ( $\text{SH}^-$ ) na cysteinovém zbytku molekuly glutathionu je reaktivní složkou celé konjugační reakce (*Reinemer et al., 1996; Gullner et al., 2018*). Kromě účasti na biotransformaci xenobiotik jsou GST zapojeny do fyziologických procesů rostlinných buněk. Byla popsána účast GST na tvorbě a modulaci iontových kanálů, tvorbě signálních kináz a biosyntéze hormonů (*Dixon et al., 2010*).



Charakteristickým rysem enzymů GST je jejich vysoká indukovatelnost širokou škálou stresových faktorů včetně abiotického stresu (*Kumar a Trivedi 2018*).

Konjugační reakce, při kterých dochází k přenosu glykosylových zbytků z nukleotidových cukrů, jsou katalyzovány **uridin-difosfát (UDP) glykosyltransferázami (UGT)**. Nadrodina UGT ve vyšších rostlinách zahrnuje enzymy, které glykosylují celou škálu akceptorových molekul (aglykonů), kterými jsou kromě xenobiotik například rostlinné hormony (*Nishimura et al., 2010*). Glykosylaci dochází k regulaci mnohých funkcí aglykonů, UGT regulují jejich biologickou aktivitu, rozpustnost a transportní vlastnosti v rostlinné buňce (*Ross et al., 2001*).

Xenobiotika s vhodnou hydroxylovou skupinou nebo aminoskupinou mohou podléhat konjugační reakci katalyzovanou **sulfotransferázami (SULT)**. Při těchto reakcích dochází k přenosu sulfonové skupiny pocházející z donorového 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfátu (PAPS) na vhodný substrát. SULT mají v primární struktuře v aktivním místě histidin a jsou charakteristické vazebnými místy PAPS. Určení specifické funkce SULT ztěžuje široké spektrum substrátů jak u živočichů, tak i rostlin (*Hirschman et al., 2014; Hirschman et al., 2017*). Vznikající sulfátové sloučeniny působí v rostlinách jako hormony, dále hrají roli v obraně proti stresu a slouží jako rezervoár síry (*Klein a Papenbrock 2004*).

Některá xenobiotika jsou konjugována s aminokyselinami, tyto reakce jsou v prvním kroku katalyzovány **acyl-CoA-syntehtázou**. V dalším kroku je vzniklý produkt konjugován s aminokyselinou, konkrétně s jejím aminem, tato reakce probíhá za účasti **N-acyltransferázy**.

Methylační reakce jsou katalyzované různými **methyltransferázami** a donorem methylové skupiny je nejčastěji S-adenosylmethionin (SAM). Při těchto reakcích dochází ke konjugaci substrátů s methylovou skupinou (*Bártíková et al., 2015*).

### **2.1.4.3 Fáze III.**

U III. fáze biotransformace, označené jako sekundární konjugace, reagují konjugáty vzniklé v II. fázi se složkami buněčné stěny, nejčastěji s ligniny nebo pektiny.

Následně dochází k uložení do vakuol. Před tím, než jsou konjugáty uloženy do buněčných struktur, je nutný jejich transport přes membránu vakuoly. U rostlin se vyskytuje ATP-dependentní membránový přenašeč (*Komives a Gullner 2005; Chromá et al., 2001*).

**ABC (ATP Binding Cassette)** transportéry jsou nejvýznamnějšími transportními proteiny u rostlin, zapojenými do energeticky dependentního přenosu xenobiotik do vakuoly. V rostlinách jsou ABC transportéry velkou nadrodinou transportních proteinů dělených do několika rodin a podrodin. Nedávné studie popsaly 132 typů ABC transportérů s rozmanitou škálou možných substrátů (*Lefevre a Boutry 2018; Rea 2007*). Hlavním úkolem ABC transportérů v biotransformaci xenobiotik je transport konjugátů vzniklých v II. fázi biotransformace z cytosolu do prostoru vakuol (*Klein et al., 2006*).

Kromě výše zmíněných ABC transportérů jsou v rostlinách přítomny **MATE (multidrug and toxin extrusion protein)** transportéry, patřící do skupiny detoxifikačních proteinů. V rostlinách jsou tyto integrální membránové proteiny zapojeny do různých funkcí, které zahrnují transport sekundárních metabolitů, transport fytohormonů a regulaci vývoje rostlin (*Upadhyay et al., 2019*).

#### **2.1.4.4 Metabolismus albendazolu v rostlinách**

Celkem bylo u rostlin detekováno 37 metabolitů ABZ, ale jejich počet se u jednotlivých rostlinných druhů lišil. Oproti savcům byl u modelových rostlin pozorován bohatější biotransformační proces anthelmintika ABZ, neboť kromě dvojstupňové oxidace vedoucí ke tvorbě ABZSO a sulfonu albendazolu byly detekovány metabolity hydrolytických, hydroxylačných a glykosidačních reakcí (*Stuchlíková et al., 2020*).

U zvonku okrouhlolistého (*Campanula rotundifolia*) ovlivněného albendazolem byly nalezeny metabolity I. i II. fáze biotransformace albendazolu. Jako metabolity druhé fáze byly detekovány především konjugáty s glukózou a také bylo nalezeno několik metabolitů O-acetyl-glukosidace. Celkem bylo v této modelové rostlině stanoveno 24 metabolitů ABZ (*Stuchlíková et al., 2016*). Studie probíhající na rákosu obecném (*Phragmites australis*) potvrdila schopnost této rostliny biotransformovat albendazol.

Celkem bylo detekováno 10 metabolitů ABZ a byly nalezeny atypické metabolity II. fáze biotransformace (acetylglukosidy, xylosylglykosidy a glukosylglykosidy). U jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*) bylo UHPLC/MS-MS analýzou detekováno 18 metabolitů ABZ (Podlipná et al., 2013; Stuchlíková et al., 2017).

U vojtěšky seté (*Medicago sativa*) bylo detekováno parentní xenobiotikum ABZ a také anthelminticky aktivní albendazolsulfoxid, celkem bylo u vojtěšky nalezeno 21 metabolitů ABZ (Stuchlíková et al., 2020).

### 2.1.5 Vliv anthelmintik na životní prostředí

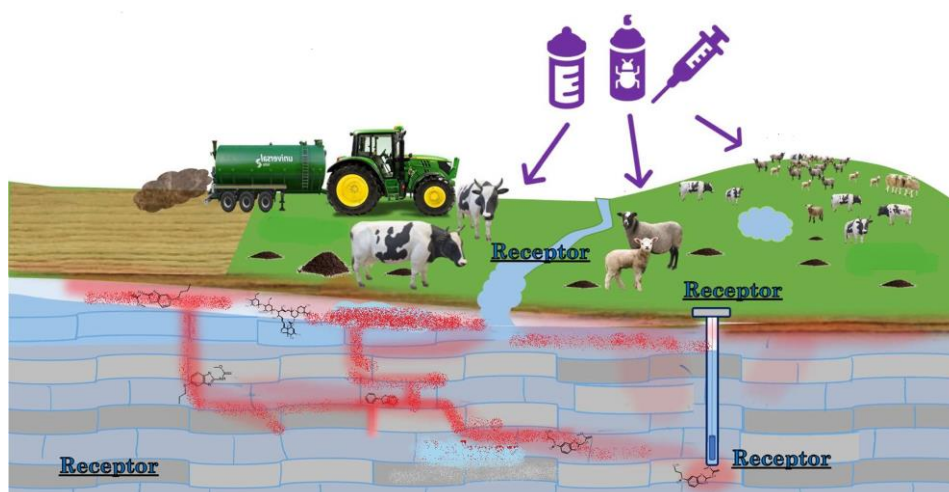
Do životního prostředí vstupuje široká škála veterinárních přípravků nejčastěji antibiotika, antiparazitika, antifungální a hormonální léčiva a mnohé další. Tato farmaka mohou ovlivňovat necílové organismy v půdě a vodě (Bártíková et al., 2016). Už v roce 1976 byl studován vliv trusu s obsahem anthelmintik na necílový organismus, brouka *Onthophagus gazela* (Liebig et al., 2010).

O vstupu veterinárních léčiv do životního prostředí rozhodují jejich fyzikálně chemické vlastnosti, především: rozpustnost, disociační konstanta a Henryho konstanta (Kotýza et al., 2009). O transportu mezi jednotlivá, rozdílná prostředí (voda/půda) rozhodují sorpční vlastnosti léčiv (Boxall 2004). Veterinární přípravky se do životního prostředí dostávají přímější cestou než humánní farmaka, která prochází čistícími procesy. Hlavní cesta kontaminace ekosystému veterinárními léčivy je: přímo výkaly zvířat, hnojením trusem léčených zvířat a odplavení z místa aplikovaných produktů (Boxall 2004; Kullik a Belknap 2017).

V životním prostředí se vyskytují velmi malé koncentrace léčiv, takže riziko akutní toxicity je minimální. Expozice nízkými dávkami léčiv a s tím spojená chronická toxicita však představují pro ekosystém problém z hlediska vzniku rezistentních druhů na příslušné léčivo a akumulaci látek v rostlinách, včetně plodin určených k lidské spotřebě (Boxall 2004; Jørgensen a Halling-Sørensen, 2000). Pro studie zaměřené na enviromentální riziko veterinárních léčiv je vhodné využít citlivé metody, které umožní stanovení velmi nízkých koncentrací (mg/l až ng/l), např. kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (Mooney et al., 2020; Wagil et al., 2015).

### 2.1.5.1 Vliv veterinárních přípravků na vodní ekosystém

Léčiva využívaná ve veterinární praxi se stávají znepokojivými kontaminanty vodního ekosystému, většina z nich se dostává do vodního prostředí z výkalů zvířat chovaných venku nebo aplikací hnoje léčených zvířat na pole (Obr. 2). Následnými mechanismy povrchového odtoku dochází k proniknutí xenobiotik do podzemních vod a blízkých vodních ploch (Mooney *et al.*, 2021; Popova *et al.*, 2013). Na ovlivnění vodních toků léčivy má také vliv eroze půdy. Riziko kontaminace je nejvyšší při nejnižším pokryvu půdy, to bývá často na podzim po sklizni nebo na jaře před setím. Nezanedbatelný vliv na ekotoxicitu veterinárních přípravků mají také klimatické podmínky, především intenzita srážek (Krogh *et al.*, 2009).



**Obrázek 2: Ovlivnění vodního ekosystému veterinárními přípravky, upraveno z Mooney *et al.*, 2021.**

I po biotransformaci veterinárních farmak v organismu zvířete a degradaci v půdě bylo ve vodách řeky sousedící se zemědělskými poli detekováno množství metabolitů anthelmintik, kokcidostatik, antibiotik a jiných přípravků užívaných při léčbě hospodářských zvířat (Iglesias *et al.*, 2012). Informací o koncentraci anthelmintik ve vodním prostředí není mnoho. Základem pro posouzení potencionálních rizik je důkladné monitorování těchto sloučenin v různých kompartmentech vodního prostředí, jako je kromě vody také sediment a vzorky rybí tkáně (Kumirska *et al.*, 2016). Studie zaměřené na detekci veterinárních přípravků v řekách, jezerech a podzemních vodách prokázaly přítomnost vybraných farmak ve vodním prostředí.

Byla studována toxicita kokcidiostatik a anthelmintik na vodní organismy a byla zjištěna výrazná toxicita na zooplankton (Mooney et al., 2020; Goessens et al., 2020).

Z konkrétních zástupců anthelmintik byly pro riziko kontaminace vodního prostředí testovány ivermektin a benzimidazolové sloučeniny fenbendazol a flubendazol. Ivermektin byl vyhodnocen jako významný kontaminant pro vodní bezobratlé živočichy konkrétně dafnie a vířníky. Fenbendazol a flubendazol a jejich metabolity byly testovány pro toxicitu jak na vodní faunu (korýše) tak floru: okřehky (*Lemna minor*) a zelené řasy (*Scenedesmus vakuolatus*). Byla zjištěna potencionální ekotoxicita těchto léčiv a mezi testovanými modely vykazoval největší citlivost na flubendazol a fenbendazol korýš *Daphnia magna* (Garric et al., 2007; Wagil et al., 2015).

Vzhledem k tomu, že zooplankton tvoří základ potravinové pyramidy pro vodní živočichy, dochází při narušení jeho reprodukce a růstu k ovlivnění celého vodního ekosystému (DeLorenzo et al., 2001).

#### **2.1.5.2 Fytotoxicita veterinárních přípravků**

Kontaminací půdy a podzemní vody veterinárními přípravky se zvyšuje riziko fytotoxicity. Na rozšiřování léčiv do půdy má vliv aplikace stabilizovaných čistírenských kalů. Zde hrají roli fyzikálně chemické vlastnosti látek, může dojít k situaci, kdy se léčivo nebo jeho metabolit naváže na částice v půdě nebo se přípravky dostanou do dalších vrstev půdy díky využívání závlahové vody a klimatickým podmínkám (Ternes et al., 2007; Kotyza et al., 2009).

V půdě se vyskytující léčiva a jejich metabolity představují rizikový kontaminant pro půdní vícedruhový systém (SMS), obsahující bezobratlé živočichy a mikroorganismy. Byl popsán toxický vliv ivermektinu na SMS (Jensen a Scott-Fordsmand 2012). Vstup xenobiotik do rostlin probíhá přes kořenový systém a může vyvolat indukci biotransformačních enzymů vedoucí k vytvoření metabolitů léčiv následně uložených do buněčných struktur rostliny (Macková a Macek 2005).

Studie probíhající *in vitro* prokázaly fytotoxický vliv benzimidazolových anthelmintik flubendazolu a fenbendazolu na rostlinné regeneranty jitrocele kopinatého (*P. lanceolata*) a huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

Po ovlivnění modelových rostlin anthelmintiky došlo k narušení metabolických a fyziologických procesů rostlin (Syslová et al., 2019; Stuchlíková et al., 2018)

U ivermektinu (IVM), zástupce makrocyclických laktonů, je vzhledem k jeho chemické povaze předpoklad pro akumulaci v životním prostředí a s tím spojenou toxicitu pro necílové organismy. Při experimentech *in vitro* byla prokázána fytotoxicita pro sóju (*Glycine max*), došlo k ovlivnění antioxidantních enzymů a metabolity IVM byly detekovány v listech a kořenech (Navrátilová et al., 2020). U huseníčku rolního (*A. thaliana*) došlo biotransformací IVM k narušení celé fyziologie modelové rostliny, včetně dysregulace transkripce genů (Syslová et al., 2019). Při studii na hořčici seté (*Sinapsis alba*) byly modelové rostliny ovlivněny IVM a byla opět prokázána fytotoxicita IVM. Došlo k inhibici růstu kořenů o 20 % i při koncentraci 50 nM IVM, kterou lze nalézt v životním prostředí (Vokřál et al., 2019).

Albendazol využitý jako modelové anthelmintikum pro tuto práci, byl také sledován jako potenciální kontaminant životního prostředí. Byly provedeny studie na několika rostlinných modelech uvedených v kapitole 2.1.4.4. Rostliny byly schopny ABZ biotransformovat a ABZ ovlivnil biotransformační procesy rostlinných regenerantů. U hořčice seté nebyl prokázán vliv ABZ na klíčivost semen. Nicméně ABZ podaný ovci domácí (*Ovis aries*) byl zastoupen v trusu, stejně jako jeho aktivní metabolit ABZSO, v koncentracích, které mohou negativně ovlivnit půdní bezobratlé (Prchal et al., 2016).

Dostupné studie o fytotoxicitě veterinárních farmak jasně ukazují, že není vhodné chovat dobytek na pastvinách, kde hrozí kontaminace životního prostředí z trusu léčených zvířat a také je značně rizikové používat trus léčených zvířat ke hnojení zemědělských ploch (Beynon 2012).

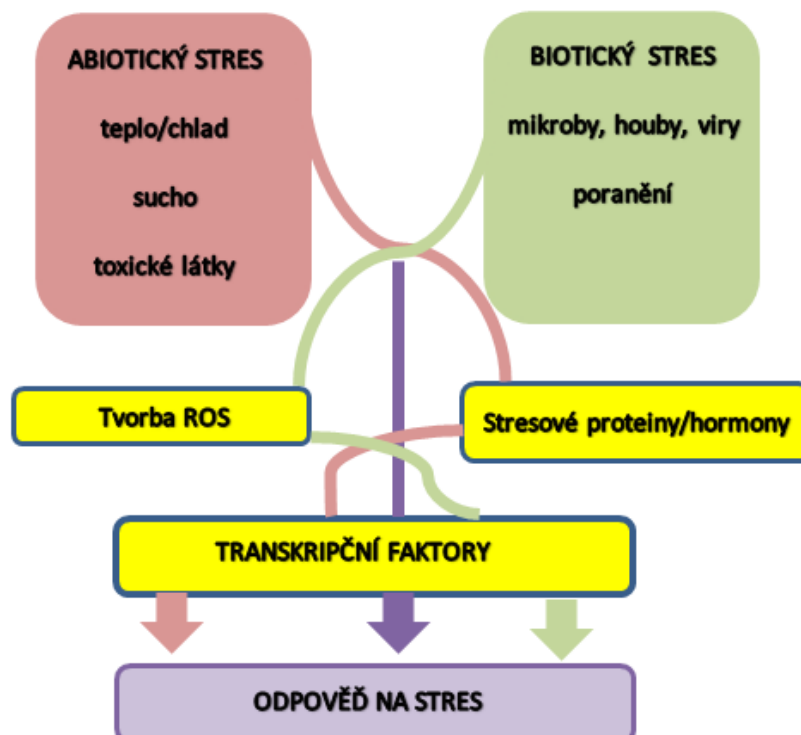
## **2.2 Oxidační stres**

Rostliny žijí v neustále se měnícím vnějším prostředí, které může vytvářet nepříznivé nebo stresující podmínky pro vývoj a růst rostlin. Mezi tyto nepříznivé vlivy prostředí patří stresory, které jsou výsledkem biotického nebo abiotického stresu.

Abiotický stres bývá způsoben toxickými látkami ve vzduchu, vodě i půdě, často se jedná o herbicidy, pesticidy, léčiva a jejich metabolity a také přítomnost těžkých kovů (hliník, kadmium aj.) (Mittler 2006; Gill a Tuteja 2010).

Dalšími abiotickými stresory jsou klimatické podmínky jako například sucho, teplo, chlad, nedostatek živin, přebytek solí (Mittler 2006; Gill a Tuteja 2010).

U stresu způsobeného suchem a solí jsou rozlišovány primární a sekundární stresové signály. Primárním signálem je hyperosmotický stres způsobený suchem, který vykazuje z důvodu rozvratu iontů v buňce toxické účinky na buňku. Sekundární účinky stresu ze sucha a solí jsou komplexní a zahrnují oxidační stres (Zhu 2016). Důležitým rysem stresu způsobeného ze sucha je tvorba signálů, které způsobí akumulaci kyseliny absciové (ABA), což vyvolá u rostliny adaptivní odpovědi (Zhu 2002). Teplotní stres jak chlad, tak teplo, mohou způsobit změnu v tekutosti fosfolipidových membrán (Sangwan et al., 2002). Biotický stres vzniká při napadení rostliny patogeny (viry, houbami, mikroby), poškození rostliny a také parazitismem a alelopatii (Atkinson a Urwin 2012; Suzuki et al., 2014). Ve vnějším prostředí jsou rostliny často vystaveny kombinaci biotického a abiotického stresu (Obr. 3).



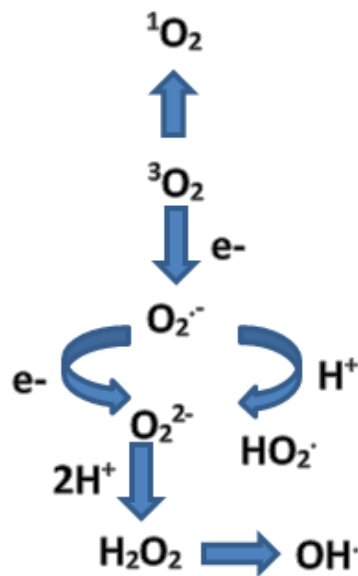
Obrázek 3: Abiotický a biotický stres v rostlinách, přeloženo ze Suzuki et al., 2014.

Je známo, že zvyšující se teplota usnadňuje šíření patogenů (*Bale et al., 2002; Madgwick et al., 2011*). Abiotické stresory oslabují obranné mechanismy rostlin, což zvyšuje jejich náchylnost k chorobám způsobeným patogeny (*Amtmann et al., 2008*).

### 2.2.1 Vznik reaktivních forem kyslíku

Pro aerobní organismy je přítomnost molekulárního kyslíku nezbytná pro život. Kyslík vyskytující se v atmosféře pochází z fotosyntetických reakcí rostlin a druhů kyanobakterií. Atmosferický kyslík obsahuje v základním stavu dva nepárové elektrony, je tedy biradikál, vykazující poměrně malou reaktivitu (*Dat et al., 2000; Piterková et al., 2005*).

Aktivace molekulárního kyslíku a s tím spojený vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) probíhá enzymatickou cestou a neenzymatickou, tzv. jednoelektronovou redukcí  $O_2$ . Pro každou počáteční reakci je nutná energie a donor elektronu. Generování ROS je znázorněno na obrázku 4 (*Das a Roychoudhury 2014*).



**Obrázek 4: Generování ROS**

ROS se v rostlinách tvoří za normálních i stresových podmínek a mezi hlavní producenty ROS v rostlinných buňkách patří chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, endoplazmatické retikulum a glyoxysomy. Tito producenti patří mezi organely s vysokou oxidační a metabolickou aktivitou a jsou charakteristické intenzivní rychlostí elektronového toku (*Mittler 2002; Mittler et al., 2006; Chodhury et al., 2013*).



V intracelulárních buněčných kompartmentech se na produkci ROS účastní množství enzymů: xanthinoxidáza, lipoxygenáza, cytochrom P450 reduktáza. V chloroplastech dochází ke tvorbě singletového kyslíku excitací chlorofylu a superoxidový radikál je tvořen v průběhu fotosyntézy. U mitochondrií vzniká superoxidový radikál jako produkt dýchacího řetězce (Mittler 2002; Mittler et al., 2006). Mimo tyto vnitrobuněčné organely se na tvorbě ROS podílí enzymatický systém v buněčné stěně a plazmatické membráně, především peroxidázy produkující H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a NADPH oxidázy redukující molekulární kyslík na superoxid radikál (Dat et al., 2000; Asada 2006).

Zástupci ROS a jejich chemická struktura, jsou uvedeni v tabulce 2, všichni tito zástupci ROS vykazují oproti molekulárnímu kyslíku vysokou toxicitu, vycházející z reaktivity ROS, která má za následek oxidační poškození buněk (Asada 2006; Piterková et al., 2005).

**Tabulka 2: Zástupci ROS, upraveno z Piterková et al., 2005**

Sloučenina ROS	Značení	Struktura
Singletový kyslík	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	O-O:
Superoxid radikál	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	[O=O:] <sup>-</sup>
Hydroxylový radikál	OH <sup>·</sup>	·O-H
Peroxid vodíku	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H-O-O-H

Superoxidový radikál je středně reaktivní zástupce ROS s krátkým poločasem rozpadu (2-4 μs), sám nezpůsobuje rozsáhlé poškození, ale při reakci s peroxidem vodíku vytváří hydroxylový radikál. Tento proces tvorby toxičtějšího zástupce ROS je známý jako Haber-Weissova reakce:



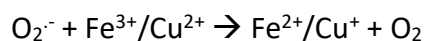
V buňkách lze nalézt také protonovanou formu superoxidového radikálu, hydroperoxyl radikál. Tento je schopen díky hydrofobní povaze procházet přes buněčné fosfolipidové membrány (Halliwell 2006).

Atypickou formou ROS je singletový kyslík, který vzniká reakcí chlorofylu v tripletovém stavu v anténním systému s O<sub>2</sub> (Hatz et al., 2007). Singletový kyslík může způsobit vážné poškození celého fotosyntetického aparátu a dalších cílových molekul v buňce jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a lipidy (Wagner et al., 2004; Krieger-Liszkay et al., 2008).

Středně reaktivním ROS je peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). V rostlinách má duální povahu v závislosti na koncentraci. Při nízkých koncentracích působí jako regulační signál pro základní fyziologické procesy jako je fotorespirace a fotosyntéza, růst a vývoj rostlinných buněk a jejich senescence (Noctor et al., 2002; Tanou et al., 2009).

Díky delšímu poločas rozpadu (1 ms) ve srovnání s ostatními ROS může H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> procházet daleko od místa vzniku a pronikat membránami. Vysoké intracelulární koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidačně poškozují thiolové a methioninové skupiny proteinů, inaktivují enzymy Calvinova cyklu, způsobuje až 50% ztrátu aktivity enzymů jako je fruktóza-1,6-bisfosfatáza a fosfofruktokináza (Halliwell 2006; Bienert et al., 2007). Funkční enzymy Calvinova cyklu jsou důležité pro průběh fotosyntézy, a proto je velmi důležitá rychlá a efektivní eliminace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zabraňující poškození chloroplastů peroxidem vodíku (Asada 1992).

Nejtoxičtější zástupcem ROS je hydroxylový radikál. Vzniká buď Haber-Weissovou, nebo Fentonovou reakcí. Fentonova reakce, tzv. oxidační cyklus přechodných kovů, je častějším producentem hydroxylového radikálu a dochází při ní k oxidaci kovů s následným přechodem zpět na redukovanou formu, reakcí se superoxidovým radikálem.



Vzhledem k tomu, že neexistuje systém, který by byl schopen hydroxylový radikál zachytit, jeho nadměrná akumulace způsobí buněčnou smrt (Pinto et al., 2003; Das a Roychoudhury 2014).

## 2.2.2 Vliv ROS na buňku

Předpokládá se, že ROS hrají v biologii rostlin dvojí roli. Fungují v buňkách jako signální molekuly, ale jsou také toxickými produkty aerobního metabolismu. Nedávné studie naznačují, že bazální hladina ROS je nezbytná pro základní biologické procesy, jako je buněčná proliferace a diferenciacie (*Mittler 2017*). Při nízkých koncentracích se jako signalizační molekula uplatňuje především peroxid vodíku, při působení abiotických nebo biotických stresorů vytváří tzv. aklimatizační toleranci na stres (*Mittler 2004*). Rostliny při interakci s patogenem vytváří ROS, především superoxid radikál a peroxid vodíku v apoplastu, které pak hrají ústřední roli v imunitní odpovědi rostlin (*Qi et al., 2017*).

Pokud nastává narušení rovnováhy mezi tvorbou a odstraněním ROS, dochází k reakci mezi ROS a biomolekulami. Hlavním cílem reaktivních forem kyslíku jsou lipidy, proteiny a DNA, při poškození dochází ke změně jejich fyziologických vlastností. Je změněna tekutost buněčných membrán, porušen transport iontů, inhibuje se enzymatická aktivita a dochází k zesíťování proteinů. Tyto negativní účinky mohou vést k buněčné smrti (*Sharma et al., 2012*).

Peroxidace lipidů zhoršuje oxidační stres prostřednictvím produkce radikálů odvozených od lipidů, které samy mohou poškozovat proteiny a DNA. Finálním produktem peroxidace nenasycených mastných kyselin ve fosfolipidech je malondialdehyd (MDA), zodpovědný za poškození buněčné membrány (*Han et al., 2009; Tanou et al., 2009*). Dva hlavní cíle ROS v membránových fosfolipidech jsou dvojná vazba mezi atomy uhlíku a esterová vazba mezi glycerolem a mastnými kyselinami. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jako kyselina linolová a linolenová, jsou zvláště citlivé na reaktivní formy kyslíku. Především hydroxylový radikál je nebezpečný, neboť je schopen vyvolat sled reakcí za vzniku lipidových peroxylových radikálů a hydroperoxidů. Tyto reaktivní sloučeniny zvyšují tekutost membrány, což způsobí přestup látek, které jinak vstupují do buňky speciálními kanály. Lipidové peroxidové radikály deaktivují membránové receptory a taktéž na membráně lokalizované enzymatické systémy (*Sharma a Dubey 2009*).

Přímý kontakt proteinu s ROS vede ke vzniku oxidovaného proteinu, který je výhodným substrátem pro proteolytickou degradaci. Jednotlivé aminokyseliny se liší v citlivosti na ROS. Nejvíce náchylné na reaktivní formy kyslíku jsou aminokyseliny obsahující thiolovou skupinu nebo síru (cystein a methionin). Superoxidový radikál je schopen oddělit atom vodíku od cysteinového zbytku za vzniku thiolového radikálu, tyto reakce vedou ke vzniku zesíťovaných reakčních produktů, které jsou schopné agregace (*Møller a Kristensen 2004; Serrano et al., 2009*). Modifikace proteinů byla popsána u světlem namáhaných rostlin, kde oxidační změny proteinů vyvolaly vedlejší produkty peroxidace lipidů (*Yamauchi et al., 2017*).

K oxidačnímu poškození DNA v důsledku ROS dochází na více úrovních, které zahrnují oxidaci deoxyribózy, modifikaci nukleotidových bází a zesíťování DNA (*Sharma et al., 2012*).

Oxidační poškození cukerných zbytků molekuly DNA vede ke tvorbě radikálu deoxyribózy, který způsobí rozbití řetězce DNA. Hydroxylový radikál způsobuje zesíťování DNA, nebo DNA a proteinů, reakcí s dvojnými vazbami purinových a pyrimidinových bází. Pokud nedojde k opravě těchto modifikací před zahájením buněčných procesů jako je replikace nebo transkripce, nastává smrt rostlinné buňky. Na oxidaci ROS jsou náchylnější mitochondriální a chloroplastová DNA, kvůli nedostatku ochranných proteinů a histonů, vyskytující se u jaderné DNA (*Sharma et al., 2012*). Zvýšená degradace DNA byla pozorována u rostlin vystavených těžkým kovům a zvýšenému množství soli v životním prostředí (*Liu et al., 2000; Meriga et al., 2004*).

## **2.3 Antioxidační systém rostlin**

### **2.3.1 Antioxidační enzymy**

Enzymy zachycující ROS jsou umístěny v různých částech rostlinné buňky. Jednotlivé buněčné kompartmenty podílející se na odstranění ROS obsahují více antioxidačních enzymů, například v cytosolu se vyskytují 3 enzymy (peroxidáza, askorbátperoxidáza a glutathionperoxidáza) odstraňující peroxid vodíku (*Suzuki a Mittler 2006*).

Rostlinný enzymatický antioxidační systém zahrnuje: katalázu, superoxidodismutázu, askorbátperoxidázu, monodehydroaskorbátreduktázu, dehydroaskorbátreduktázu, glutathionperoxidázu, glutathionreduktázu a glutathion-S-transferázu.

### **2.3.1.1 Studované enzymy**

#### **ASKORBÁTPEROXIDÁZA (APX)**

Askorbátperoxidáza je ústředním enzymem v askorbát-glutathionovém cyklu (AsA-GSH). APX redukuje peroxid vodíku na vodu za účasti kyseliny askorbové (AsA) jako redukčního činidla, donoru elektronů. Při redukční reakci dochází jak k redukci  $H_2O_2$ , tak k oxidaci AsA na monodehydroaskorbovou kyselinu. Rodina APX zahrnuje 5 izoformem, lišících se jak uspořádáním aminokyselinového řetězce, tak lokalizací v buňce. Jsou známy cytosolická, mitochondriální, peroxisomální, chloroplastová a thylakoidní izoforma APX. APX je považována za jeden z nejvíce distribuovaných antioxidačních enzymů a izoformy APX mají mnohem větší afinitu k peroxidu vodíku než kataláza (CAT). Oproti CAT dokáže APX reagovat na velmi nízké koncentrace peroxidu vodíku (*Sharma et al., 2012; Day a Roychoudhury 2014*).

#### **KATALÁZA (CAT)**

Kataláza je tetramerní enzym obsahující hem. Jedná se o velmi aktivní enzym a na rozdíl od jiných antioxidačních enzymů nepotřebuje pro svou funkci redukční činidla. Vykazuje duální aktivitu: hydroperoxidázovou a peroxidázovou. Při hydroperoxidázové aktivitě CAT vykazuje afinitu k peroxidu vodíku a způsobuje dismutaci  $H_2O_2$  na vodu a kyslík (*Mittler 2002*). Peroxidázová aktivita CAT umožňuje oxidaci různých substrátů, např. etanolu, metanolu a formaldehydu (*Mhamdi et al., 2010*).

U krytosemenných rostlin byly identifikovány 3 izoformy CAT. CAT1 je obsažena ve fotosyntetických tkáních, kde se podílí na odstranění  $H_2O_2$  vytvořeného v průběhu fotorespirace. CAT2 se produkuje ve vaskulárních tkáních, především v listech a účastní se lignifikace buněčné stěny. CAT3 je hojně obsažena v semenech a mladých rostlinách a tato třída kataláz se účastní odstranění peroxidu vodíku, produkovaného během degradace mastných kyselin v glyoxylátovém cyklu v glyoxysomech (*Ahmad et al., 2010; Das a Roychoudhury 2014*).

### **GLUTATHIONPEROXIDÁZA (GPX)**

Glutathionperoxidáza je důležitým enzymem, podílejícím se na ochraně buněčné membrány zabráněním peroxidace lipidů obsažených v membráně. GR redukuje peroxid vodíku z organických peroxidů a lipidových peroxidů a jako redukční činidlo využívá glutathion. Při reakci vzniká z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> voda a zároveň dochází k oxidaci redukované formy GSH na oxidovanou formu GSSG. Podobně jako u živočichů i u rostlin zastává GPX funkci regulátoru signálních drah a transkripční aktivity (*Piterková et al., 2005; Das a Roychoudhury 2014*).

### **GLUTATHIONREDUKTÁZA (GR)**

Glutathionreduktáza je flavoproteionová oxidoreduktáza, využívající NADPH jako redukční činidlo. GR je důležitý enzym AsA-GSH cyklu, katalyzuje tvorbu disulfidové vazby v glutathiondisulfidu a tím udržuje správný poměr redukované a oxidované formy glutathionu (GSH/GSSG) v rostlinné buňce. Vyskytuje se především v chloroplastech, ale také v mitochondriích a cytosolu (*Das a Roychoudhury 2014*).

### **GLUTATHION-S-TRANSFERÁZA (GST)**

Rostlinné glutathion-S-transferázy jsou multifunkční enzymy, kódované velkými genovými rodinami. Charakteristickým rysem je vysoká indukovatelnost širokou škálou stresových podmínek včetně biotického stresu. GST jsou specificky upregulovány v případě napadení rostliny infekcí (bakteriální, virovou i plísňovou). GST se uplatňuje především v II. fázi biotransformace, kde katalyzuje konjugační reakci xenobiotik s endogenním tripeptidem glutathionem. Glutathion-S-transferáza není enzymem první linie obrany proti ROS, jako SOD, CAT nebo APX, ale představují tzv. druhou obrannou linii, díky své schopnosti detoxikovat produkty působení ROS. Vznikající produkty oxidačního poškození jsou vázány na redukovaný glutathion za účasti GST a jsou pak dále zpracovány. Tato aktivita GST, účastní se na antioxidantním systému rostlin se označuje jako peroxidázová, nejčastějšími substráty této reakce jsou epoxidy, a hydroperoxydy (*Dixon et al., 2009; Gullner et al., 2018*).

## **PEROXIDÁZA (POX)**

Všechny živé organismy mají peroxidázy, které katalyzují oxidační reakce s využitím peroxidu vodíku, jako akceptoru elektronů. Vyšší rostliny obsahují nejméně 4 typy peroxidáz: glutathionperoxidázu, katalázu, askorbátperoxidázu a klasické sekreční rostlinné peroxidázy (PRx). PRx jsou specifické oxidoreduktázy obsahující ve své molekule hem. Jedná se o enzymy s různou škálou funkcí, jsou zapojeny do procesu lignifikace, prodloužení buněk a zapojení do obrany proti stresu.

V peroxidačním cyklu PRx katalyzuje redukci peroxidu vodíku na vodu a zároveň dochází k oxidaci substrátů. Pokud je oxidovaným substrátem molekula, které je schopna tvořit ROS jako například thiol nebo kyselina salicylová, dochází ke vzniku superoxidového radikálu, vzniká tedy zástupce ROS. PRx proto nemusí fungovat pouze jako antioxidační enzym, podílející se na odstranění ROS, ale také jako faktor pro generování ROS (*Shigeto a Tsutsumi 2016*).

## **SUPEROXIDDISMUTÁZA (SOD)**

Patří do rodiny metaloenzymů a tvoří první obrannou linii proti působení ROS. SOD katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu na kyslík a peroxid vodíku, touto reakcí je zabráněno vzniku hydroxylového radikálu ze superoxidového radikálu v procesu Haber-Weissovy reakce. Vzhledem k tomu, že fosfolipidová membrána není propustná pro superoxidový radikál, je nutná přítomnost SOD ve všech místech buňky, kde dochází k produkci  $O_2^-$  (*Fukai a Ushio-Fukai 2011; Das a Roychoudhury 2014*). Podle kovových kofaktorů přítomných v aktivním místě je SOD dělena na několik izoform, v rostlinných buňkách jsou to především: Mn-SOD (v mitochondriích), Fe-SOD (v chloroplastech) a Cu/Zn-SOD (v cytosolu, chloroplastech a peroxisomech) (*Mittler 2002*). Aktivita SOD je regulována abiotickými stresovými podmínkami. Byla prokázána zvýšená aktivita SOD při zvýšeném množství soli u modelových rostlin (kukuřice a hrachu) a také byla silně indukována při kombinaci sucha a zvýšených světelných podmínek (*Ahmad et al., 2008; Tuna et al., 2008*).

### 2.3.2 Neenzymové antioxidanty

Obrany před působením ROS na buňku se účastní kromě výše zmíněných antioxidantních enzymů také neenzymatický antioxidantní systém. V rostlinách neenzymatické antioxidanty představují nízkomolekulární sloučeniny jako je kyselina askorbová, tokoferol, karotenoidy, glutathion a fenolové sloučeniny. Mechanismus účinku těchto molekul je založen na modifikaci buněčných metabolických funkcí, zaměřených na interakci s polynenasycenými acylovými skupinami lipidů a stabilizaci membrán. Neenzymatické antioxidanty vykazují synergickou funkci s dalšími antioxidanty, včetně enzymatických, například v AsA-GSH cyklu (*Ahmad et al., 2010; Pinto-Marijuan a Munne-Bosch 2014*).

Z neenzymatických antioxidantů je kyselina askorbová (AsA) nejhojnějším hydrofilním antioxidantem, lokalizovaná je především v listech a asi 30-40 % AsA je obsaženo v chloroplastech. AsA vychytává ROS, především peroxid vodíku, který je substrátem pro askorbátperoxidázu, což vede k vytvoření oxidované formy AsA dehydroaskorbátu (*Pinto-Marijuan a Munne-Bosch 2014*). Hlavní funkcí tokoferolů je inhibice peroxidace lipidů v tylakoidních membránách, při reakci tokoferolu a ROS dochází ke vzniku tokoferoxylových radikálů. Pro regeneraci těchto radikálových sloučenin zpět na tokoferol spolu kooperují askorbát a redukovaná forma glutathionu a tím se také účastní inhibice oxidačního poškození buněčných membrán (*Asada et al., 2006, Piterková et al., 2005*).

#### 2.3.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou syntetizovány v rostlinách, řasách, bakteriích a některých kvasinkách. Hrají klíčovou roli ve fotosyntéze, fotoochraně a produkci fytohormonů (kyselina absciová a strigolakton) v rostlinných buňkách (*Sathasivam et al., 2020*). Karotenoidy se dělí na dvě skupiny: karoteny ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten) a xantofyly (lutein, zeaxanthin, astaxanthin, fucoxanthin, peridin).

Jejich funkce v antioxidantní obraně proti ROS spočívá v efektivním zhášení excitovaného stavu chlorofylu v tripletovém stavu, čímž je zamezeno tvorbě singletového kyslíku (*Piterková et al., 2005; Maoka 2019*).



Chlorofyl ve fotosyntéze působí v singletním stavu excitace ( $^1\text{Chl}\cdot$ ), v tomto stavu má krátkou životnost, po přechodu do tripletního stavu ( $^3\text{Chl}\cdot$ ) se délka jeho působení prodlužuje.  $^3\text{Chl}\cdot$  po srážce s molekulárním kyslíkem přechází do základního stavu a kyslík do reaktivního stavu, singletového kyslíku. Karotenoidy jsou schopny přejímat excitaci od chlorofylu v tripletním stavu a vznikající excitované karotenoidy v tripletním stavu nereagují s molekulami kyslíku, nedochází tedy ke vzniku ROS. Tripletní stav karotenoidů je redukován na základní stav uvolněním tepla. Karotenoidy jsou tedy schopny velmi rychle odstranit singletový kyslík (*Piterková et al., 2005; Maoka 2019*).

Nedávné studie ukázaly, že se karotenoidy mohou podílet nejen na odstranění singletového kyslíku, ale také superoxidového radikálu a hydroxylového radikálu tvorbou epoxidu nebo edoperoxidu (*Maoka 2019*).

Karotenoidy jsou spolu s chlorofyly základními pigmenty fotosyntetických tkání rostlin. Chlorofyly jsou základní fotoreceptory, účastníci se procesu fotosyntézy a ve své molekule obsahují porfyrinový kruh s kationtem  $\text{Mg}^{2+}$  a uhlovodíkový řetězec. U zelených rostlin se vyskytuje především chlorofyl A, který je pro fotosyntézu více významný než chlorofyl B, čemuž odpovídá i poměr v jakém se v rostlinách vyskytují, tedy 3:1 (chl A:chl B) (*Špulák et al., 2011*).

### **2.3.2.2 Význam stanovení koncentrace chlorofylů a karotenoidů**

Kvantifikace fotosyntetických pigmentů zapojených do absorpce světla je vhodný marker informující o skutečné funkční kapacitě fotosyntetických aparátů. Jak karotenoidy, tak chlorofyly se podílí na absorpci záření pro fotosyntézu a karotenoidy navíc zastávají funkci antioxidační. Změny v jejich koncentracích nastávají po vystavení rostliny abiotickému stresu. Působením nepříznivých klimatických podmínek jako je sucho, zvýšená salinita prostředí a další, dochází ke snížení koncentrace karotenoidů a chlorofylů. Při zátěži rostlin xenobiotiky a toxickými látkami je v důsledku mobilizace antioxidačního systému před vznikem ROS zvýšený obsah fotosyntetických pigmentů. Koncentrace světlosběrných pigmentů je tedy vhodným ukazatelem pro sledování vlivu více abiotických stresů působících na rostliny během růstu (*Pinto-Marijuan a Munne-Bosch 2014*).

## 2.4 Vojtěška setá (*Medicago sativa*)

Vojtěška setá (*Medicago sativa*) byla zvolená jako modelová rostlina pro tuto práci. Jedná se o víceletou píceňinu původně pocházející z Malé Asie, patřící do čeledi bobovitých (*Fabaceae*), rodu tolíce (*Medicago*) (Deyl a Hísek 2001).



**Obrázek 5: Vojtěška setá (*Medicago sativa*)**

Autor: Ivar Leider

Vojtěška dorůstá délky 30-90 cm, lodyha je bohatě větvená s trojčetnými listy. Jedná se o rostlinu hmyzosubnou, dlouze kvetoucí. Květenství tvoří kulovitý hrozen čítající průměrně 15 květů fialové barvy (Obr. 5). Semena mají typicky ledvinovitý tvar (Velich 1991; Graman 1991). Rostliny vojtěšky seté jsou poměrně náročné na půdní podmínky, na klimatické podmínky naopak vykazují adaptabilitu (Velich 1991).

### 2.4.1 Obsahové látky

Vojtěška setá obsahuje množství bioaktivních komponent, především: škrob, bílkoviny a sacharidy. Další obsahové látky vojtěšky jsou uvedeny v tabulce 3 (Bora a Sharma 2011; Caunii et al., 2012).

**Tabulka 3: Obsahové látky vojtěšky seté, přeloženo a upraveno z Bora a Sharma 2011; Caunii et al., 2012**

<b>Alkaloidy</b>	asparagin, trigonelin, stachydrin
<b>Aminokyseliny</b>	lysin, arginin, histidin, tyrosin, methyonin, asparagin, serin, alanin
<b>Kumariny</b>	myrsellinol, scopoletin, esculetin
<b>Enzymy</b>	izoflavonové reduktázy, iminopeptidázy, aminopeptidázy
<b>Flavonoidy</b>	quercetin, myricetin, luteolin, apigenin, chrysoeriol, tricín,
<b>Fenoly</b>	kyselina kumarová, hydroxybenzoová kyselina vanilová, kyselina ferulová, kyselina salicylová, kys. sinapová
<b>Fytoestrogeny</b>	kumestrol, genistein, formometin, diadzein, biokanin A
<b>Vitaminy</b>	A, D, E, K, C
<b>Minerály</b>	vápník, hořčík, železo, zinek, fosfor, draslík

#### 2.4.2 Využití vojtěšky v zemědělství

Pro velké množství bílkovin, vitaminů a minerálních látek je vojtěška setá využívána jako objemové krmivo dobytka. Rostliny vojtěšky lze využít jako čerstvé tzv. zelené krmení, jako surovinu pro sušení sena, nebo jako složku granulovaného krmiva (Boháč et al., 1990).

Vojtěška je díky nízké pufrací kapacitě a nízké koncentraci ve vodě rozpustných sacharidů těžce silážovatelná. Bylo ale zjištěno, že použitím mikrobiálních látek, konkrétně bakterií mléčného kvašení lze docílit dobré fermentace a tím spustit proces siláže u vojtěšky (Agarussi et al., 2019; Li et al., 2020). Využití vojtěšky seté v silážích se ukázalo jako výhodnější oproti kukuřičným silážím, které jsou často zdrojem acidózy dobytka (Thomson et al., 2018).

Vojtěška setá patří mezi nejvíce vysazované pícniny na světě, především pro své obsahové látky a také adaptabilitu na různé prostředí (Fernandez et al., 2019). V poslední době bylo navrženo několik postupů genového inženýrství ke zkvalitnění a zvýšení výnosu této plodiny (Lei et al., 2017; Lorenzo et al., 2020).

### 2.4.3 Využití vojtěšky v medicíně

Listy, semena i klíčky vojtěšky seté mají využití i v humánní medicíně, poskytují významné množství antioxidantů přispívající k posílení imunity. Antioxidační vlastnosti vojtěšky seté vycházejí z vysokého obsahu flavonoidů a polyfenolů (*Bora a Sharma 2011*).

*In vitro* výzkum extraktu vojtěšky seté prokázal antioxidační vlastnosti a tím účinnost *Medicago sativa* v léčbě chorob, na jejichž vznik mají vliv volné radikály (*Rana et al., 2010*). Na zvířecích modelech byly prokázány protizánětlivé a analgetické účinky vojtěšky seté (*Seddighfar et al., 2020*). Další studie se zabývala terapeutickým potenciálem *M. sativa* v léčbě cerebrovaskulárních onemocnění, i v tomto případě byly potvrzeny antioxidační účinky vojtěšky (*Bora a Sharma 2011*).

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit, zda albendazol uvolněný z trusu ovcí do životního prostředí může mít vliv na antioxidační systém vojtěšky seté (*Medicago sativa*).

Pro dosažení základního cíle bylo potřeba splnit tyto dílčí cíle:

- 1) Zpracovat rostlinný materiál vojtěšky pěstované v roce 2019 a v roce 2020 na subcelulární frakce
- 2) Stanovit koncentraci bílkovin v kontrolních vzorcích a ve vzorcích ovlivněných ABZ.
- 3) Stanovit specifickou aktivitu vybraných antioxidačních enzymů (APX, CAT, GPX, GR, GST, POX, SOD) u kontrolních i ovlivněných vzorků.
- 4) Změřit koncentraci chlorofylů a karotenoidů v listech rostlin kontrolních i ovlivněných.
- 5) Získaná data statisticky zpracovat, zjistit, zda došlo k ovlivnění antioxidačního systému vojtěšky seté albendazolem a porovnat výsledky u rostlin pěstovaných v různých letech.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Pomůcky, přístroje, chemikálie

#### 4.1.1 Pomůcky

- Nůžky, pinzeta, třecí misky, tlouček, navažovací lodičky, lžičky, míchadla, kádinky, zkumavky (Eppendorf).
- Automatické pipety (Eppendorf), multikanálové pipety (Eppendorf), špičky na pipety.
- Mikrotitrační destičky s plochým dnem (GREINER), s vypouklým dnem (GAMA), UV mikrotitrační destičky.
- Keramické homogenizační kuličky, zkumavky Falcon, optické kyvety.

#### 4.1.2 Přístroje

Analytické váhy – Scaltec

Centrifuga – Biofuge Stratos Heraeus

Centrifuga – Eppendorf (5810R)

Homogenizátor – MP Biomedicals (The Fast Prep 2456)

pH metr – WTW InoLab

Spektrofotometr – CECIL (CE 1010)

Spektrofotometr – TECAN Infinite M200

Spektrofotometr – TECAN Spark

Thermomixer – Eppendorf comfort

Třepačka – Heidolph Multi Reax

Třepačka – Minishaker (MS2)

Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonopuls (HD 2070)

#### 4.1.3 Chemikálie

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)

Penta

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Penta

100% methanol

Sigma

Albendazol (ABZ)

Sigma Aldrich

Anilin

Sigma

Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG)	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Fluka
Glutathion (GSH)	Kochlight Laboratories
Glutathion disulfid (GSSG)	Sigma Aldrich
Glutathionreduktáza (GR)	Sigma
Guajakol	Sigma
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma Aldrich
Molybdenan amonný	Lachema
Polyvinylpyrolidon (PVP)	Sigma Aldrich
Pyrokatechol	Lachema
Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH)	Sigma Aldrich
t-butyl-hydroperoxid	Sigma Aldrich
TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl	Penta

#### **4.1.4 Biologické vzorky**

Jako biologický materiál sloužila vojtěška vypěstovaná na poli hnojeném trusem ovcí léčených ABZ i ovcí neléčených (kontrolní vzorky). Experimentální část byla provedena na subcelulárních frakcích připravených z vojtěšky. U některých měřených enzymů nebyla detekována žádná aktivita. Pro kontrolu správnosti metody byly použity subcelulární frakce jaterního homogenátu potkana.

#### **4.1.5 Programy**

iTecan control

Microsoft Excel – grafické zpracování

Statistické vyhodnocení - GraphPad Prism 9.0.2., nepárový t – test s Welchovou korekcí, 2 hladiny statistické významnosti ( $p = 0,05$ ;  $p = 0,01$ ).

## **4.2 Metodika přípravy rostlinného materiálu**

### **4.2.1 In vivo pěstování rostlin**

Rostliny vojtěšky seté byly pěstovány na poli v přirozených podmínkách. Experiment probíhal v zemědělském družstvu v Býšti. První várka rostlin byla ovlivněna na konci února (27. 2. 2019), hned jak po zimě začaly rostliny rašit. K centrálním rostlinám byl aplikován trus ovcí léčených ABZ (ve dvou různých množstvích, 35 g trusu nebo 105 g trusu) nebo ovcí neléčených (35 g trusu, kontrolní vzorky) (Obr. 6).



**Obrázek 6: Aplikace trusu k centrální rostlině**

Sběr rostlin proběhl v květnu 2019. Z této várky vznikly 3 skupiny vzorků rostlin, a to vzorek kontrolní (KON), vzorek 35g ABZ a vzorek 105g ABZ. Experiment byl opakován u druhé várky rostlin o rok později. Aplikace trusu proběhla na začátku března 2020 (2. 3. 2020) a rostliny byly sklizeny v květnu 2020. Z této várky rostlin byly odebrány 2 skupiny vzorků, a to KON a 105g ABZ.

### **4.2.2 Klimatické podmínky**

Pro zjištění případných meziročních rozdílů v klimatických podmínkách pro růst rostlin, byly retrospektivně sledovány 3 klimatické parametry: srážky, teplota vzduchu a trvání slunečního svitu (Tab. 4).



**Tabulka 4: Klimatické podmínky v letech 2019 a 2020**

	<b>březen</b>	<b>duben</b>	<b>květen</b>	<b>průměr</b>
<b>srážky (mm) 2019</b>	37,6	35,3	103,1	<b>58,7</b>
<b>srážky (mm) 2020</b>	29,6	15,4	45,9	<b>30,3</b>
<b>teplota (°C) 2019</b>	7,0	11,1	12,1	<b>10,1</b>
<b>teplota (°C) 2020</b>	5,2	10,8	12,2	<b>9,4</b>
<b>sluneční svit (h) 2019</b>	140,0	241,4	188,9	<b>190,1</b>
<b>sluneční svit (h) 2020</b>	182,9	309,0	227,5	<b>239,8</b>

Z tabulky 4 obsahující data z ČCHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), je patrné, že teplota vzduchu byla v letech 2019 i 2020 ve sledovaném období téměř stejná. U ostatních dvou parametrů jsou patrné rozdíly. Avšak z uvedených průměrných hodnot těchto parametrů, lze konstatovat, že obě várky rostlin měly podobné klimatické podmínky.

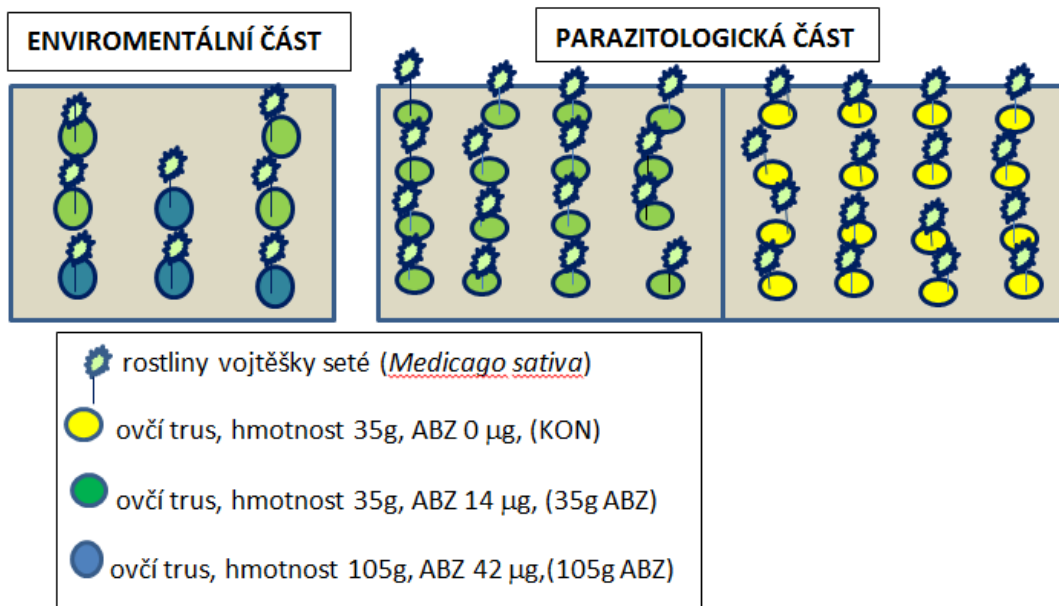
#### **4.2.3 Metodika sběru trusu**

Pro hnojení rostlin bylo využito trusu ovce domácí (*Ovis aries*). Směsný vzorek trusu pocházel od 10 samců ovcí, které byly samostatně ustájeny. Albendazol byl zvířatům podáván v dávce 10 mg ABZ/kg živé hmotnosti. Trus byl sbírán po dobu 24 hodin. Z celkového množství trusu byl metodou kvartace vytvořen reprezentativní vzorek o váze 1500 g.

#### **4.2.4 Aplikace trusu k rostlinám a vzorkování**

Hnojení pole se dle Výzkumného ústavu rostlinné výroby doporučuje v jarních měsících (Klír *et al.*, 2018). Obě várky vojtěšky byly dle tohoto doporučení hnojeny na konci února/začátku března. Byly vytvořeny 3 skupiny rostlin, trus byl aplikován kolem centrální rostliny (Obr. 7). Kontrolní skupina rostlin (KON) byla hnojena 35 g trusu od ovcí, kterým nebyl podán albendazol. Ke druhé skupině rostlin (35g ABZ) bylo aplikováno 35 g trusu, kde bylo předchozí kvantitativní analýzou zjištěno množství albendazolu 14 µg.

Třetí skupina rostlin (105g ABZ) byla hnojena 105 g trusu, kde byl albendazol v množství 42 µg. Vzorkování rostlin probíhalo před první sečí rostlin. Rostliny byly odebrány celé, aby bylo dosaženo simulace sečení, byly ustříženy 3 cm od země. Dále byly uloženy na suchý led, převezeny na Katedru biochemických věd FaF UK, kde byly uchovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C pro další zpracování.



**Obrázek 7: Experiment v reálných podmínkách.**

### 4.3 Příprava subcelulárních frakcí

#### 4.3.1 Extrakční roztok

Pro přípravu 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,0) bylo využito těchto roztoků:

- 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pro jeho přípravu bylo naváženo 1,95 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  a rozmícháno v 250 ml redestilované vody.
- 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , bylo naváženo 8,95 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  a rozpuštěno v 500 ml redestilované vody.

Oba roztoky byly smíchány na požadované pH 7, při kontrole na pH metru. Pro přípravu extrakčního roztoku bylo použito 200 ml 50 mM fosfátového pufru pH 7. Toto množství bylo před izolací subcelulárních frakcí obohaceno: 2 g PVP, 6 mg EDTA a 77 mg DTT.

### 4.3.2 Subcelulární frakce

Pro přípravu subcelulárních frakcí byly využity listy vojtěšky seté. Listy byly homogenizovány tlučkem na suchém ledu v třecí misce. Rostlinný materiál byl po rozemletí zvážen na analytických vahách, převeden do kyvet a zalit pracovním pufrem v poměru 1:3. Před centrifugací byly vzorky dále homogenizovány v chladicím boxu pomocí ultrazvukového homogenizátoru Sonopuls po dobu 20 vteřin ve dvou cyklech. Pro centrifugaci byla využita centrifuga Eppendorf, vzorky byly stáčeny 30 min při 20 000 g, centrifuga byla chlazená na 4°C. Po stočení byly kyvety se vzorky přeneseny do chladicího boxu k dalšímu zpracování (Obr. 8).



**Obrázek 8: Příprava subcelulárních frakcí v chladicím boxu**

Supernatant z kyvet byl slit do kádinek a za stálého míchání na míchačce byl rozpipetován do jednotlivých zkumavek. Každá zkumavka obsahovala asi 0,5 ml subcelulární frakce, což je 20 000 g supernatant. Takto připravené vzorky byly zmrazeny ve freezeru na -80 °C a byly použity pro stanovení aktivity antioxidantních enzymů a koncentrace bílkovin.

#### **4.4 Stanovení koncentrace bílkovin**

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bylo využito metody dle Bradfordové. Tato metoda je založena na interakci proteinů s Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBBG) v kyselém prostředí. Tím dochází k posunu absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm. Po reakci činidla CBBG s proteinem se původní hnědé zbarvení roztoku mění na modré ( $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ ). Výsledná intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku (*Jones et al., 1989*).

Byla sestavena kalibrační křivka, kde byl jako standard použit roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 2 mg/ml. Osmibodová kalibrační křivka měla koncentraci standardů v rozmezí 0  $\mu\text{g/ml}$  – 1400  $\mu\text{g/ml}$ . Do mikrotitrační GAMA destičky bylo napipetováno 5  $\mu\text{l}$  vzorku, následně bylo multikanálovou pipetou přidáno 200  $\mu\text{l}$  barevného roztoku CBBG. Jako slepý vzorek byl použit fosfátový pufr. Po 30 minutové inkubaci při 25°C v Thermomixeru Eppendorf, byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan.

#### **4.5 Stanovení aktivity studovaných enzymů**

Měření aktivity enzymů bylo provedeno vždy ve 3 na sobě nezávislých experimentech, jak u rostlin z roku 2019 (KON, 35g ABZ, 105g ABZ), tak u vzorků 2020 (KON, 105g ABZ). V jednotlivých experimentech bylo měřeno vždy 8 paralelních stanovení od každého vzorku. Naměřené hodnoty byly poté pro každou várku průměrovány a statisticky zpracovány.

##### **4.5.1 Stanovení aktivity askorbátperoxidázy**

Metoda je založená na spektrofotometrickém měření poklesu absorbance, ke kterému dochází při reakci kyseliny askorbové s peroxidem vodíku. V této reakci vzniká z kyseliny askorbové kyselina dehydroaskorbová. Rozdíl absorbance je počítán z oblasti lineárního poklesu (*Nakano a Asada 1987; Vanacker et al. 1998*).

Postup přípravy jednotlivých použitých roztoků:

- 50 mM K-fosfátový pufr, bylo naváženo 4,35 g  $K_2HPO_4$  a rozpuštěno v 500 ml redestilované vody. Bylo naváženo 1,7 g  $KH_2PO_4$  a rozpuštěno ve 250 ml  $H_2O$ . Oba roztoky byly smíchány na požadované pH 7,0 při kontrole na pH metru.
- 6 mM roztok askorbátu, v 9 ml  $H_2O$  bylo rozpuštěno 10 mg askorbátu.
- 2 mM  $H_2O_2$ , do 9 ml redestilované vody byl napipetován 1 ml 50 mM pufru a 2  $\mu$ l 30%  $H_2O_2$ .

Měření absorbance probíhalo v UV transparentní mikrotitrační destičce, do které bylo napipetováno následující množství roztoků: 144  $\mu$ l 50 mM K-fosfátového pufru, 18  $\mu$ l 6 mM roztoku askorbátu, 18  $\mu$ l 2 mM roztoku peroxidu vodíku a 20  $\mu$ l biologické frakce. Všechny objemy kromě biologické frakce byly pipetovány multikanálovou pipetou. Vzorky biologické frakce byly pipetovány do jamek jednotlivě automatickou pipetou. Na přístroji Tecan byl měřen pokles absorbance při vlnové délce 290 nm.

Pro výpočet aktivity askorbátperoxidázy by využit vzorec:

$$\text{aktivita (U)} = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{bl}) \times V_i}{\epsilon \times l \times V_s}$$

$\epsilon$  = molární extinkční koeficient ( $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$l$  = výška jamky

$V_i$  = objem reakční směsi

$V_s$  = objem biologické frakce

## 4.5.2 Stanovení aktivity katalázy

### 4.5.2.1 Metoda s molybdenanem amonným

Principem metody je reakce molybdenanu amonného s  $H_2O_2$ , při které vzniká komplex žluté barvy. Intenzita absorbance barevného komplexu se měří při 405 nm. Kataláza mění peroxid vodíku na vodu, čímž dojde k poklesu koncentrace peroxidu vodíku, který reaguje s molybdenanem a dochází k poklesu absorbance (Góth, 1991).

Pro stanovení bylo využito těchto roztoků:

- 32,4 Mm molybdenan amonný, bylo naváženo 0,8 g molybdenanu amonného a toto množství bylo rozpuštěno ve 20 ml redestilované H<sub>2</sub>O
- 60 mM Na/K-fosfátový pufr (pH 7,4), bylo naváženo 10,47 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O a 4,08 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, obě navážky pak byly rozpuštěny v 500 ml vody. Pomocí pH metru byly oba roztoky smíchány na výsledné pH roztoku 7,4.
- 6,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 14,47 μl 30% peroxidu vodíku bylo napipetováno do 20 ml 60 mM Na/K pufru.

**Tabulka 5: Metodika stanovení CAT na mikrotitrační destičce GAMA**

	<b>vzorek</b>	<b>blank 1</b>	<b>blank 2</b>	<b>blank 3</b>
<b>1</b>	100 μl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 μl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 μl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 μl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>2</b>	20 μl subcel.fr.	100 μl molyb.	20 μl pufr	20 μl pufr
<b>3</b>	<b>Inkubace 1 min při 25°C v thermomixéru</b>			
<b>4</b>	100 μl molyb.		100 μl molyb.	100 μl molyb.
<b>5</b>	<b>1 minutu nechat stát</b>			
<b>6</b>		20 μl subcel.fr.		
<b>7</b>	<b>Měření absorbance při 405 nm na přístroji Tecan</b>			

V tabulce 5 je uvedeno složení jednotlivých slepých vzorků (blank 1 – 3) a vzorků. U blanku 1 bylo potřeba napipetovat frakci vzorku co nejrychleji a eliminovat tvorbu bublinek. Pro výpočet aktivity katalázy byl využit tento vzorec:

$$\text{aktivita (U)} = \frac{(\Delta A_{bl1} - \Delta A_{vz})}{(\Delta A_{bl2} - \Delta A_{bl3})} \times 32,5$$

A<sub>bl1</sub>- absorbance blanku 1

A<sub>bl2</sub>- absorbance blanku 2

A<sub>bl3</sub>- absorbance blanku 3

A<sub>vz</sub>- absorbance vzorku

#### 4.5.2.2 Metoda s $H_2O_2$

Působením katalázy na peroxid vodíku dochází k rozkladu  $H_2O_2$  na vodu. Tato reakce je sledována jako pokles absorbance při 240 nm (Werma et al., 2003).

Do 1 jamky v UV destičce Eppendorf bylo napipetováno:

- 250  $\mu$ l 100 mM  $KH_2PO_4$  pufru (pH=7,0)
- 40  $\mu$ l 200 mM  $H_2O_2$  – bylo smícháno 230  $\mu$ l 30%  $H_2O_2$  a 10 ml  $KH_2PO_4$  pufru
- 5  $\mu$ l biologické frakce

Byla měřena absorbance na přístroji Tecan při 240 nm. Pro výpočet aktivity byl použit molární extinkční koeficient peroxidu vodíku ( $\epsilon_{H_2O_2} = 0,036 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.5.3 Stanovení aktivity glutathionperoxidázy

Metoda je založená na reakci, kterou katalyzuje glutathionperoxidáza (GPx) a dochází k oxidaci glutathionu (GSH) na GSSG. GSSG je redukován glutathionreduktázou (GR), která zajišťuje konstantní hladinu GSH. Reakce je doprovázena oxidací NADPH, což se projeví jako pokles absorbance, která je měřena fotometricky při 340 nm. (Flohé, 1984; Handy et al., 2009)

Pro stanovení aktivity GPX byly využity tyto roztoky:

- 0,1 M K-fosfátový pufr
- 20 mM EDTA, ve 4 ml K-fosfátového pufru bylo rozmícháno 29,76 mg EDTA.
- Roztok GR vznikl smícháním 132  $\mu$ l a 5,88 ml K-fosfátového pufru.
- Roztok GSH vznikl smícháním 30,7 mg a 10 ml K-fosfátového pufru.
- 4 mM NADPH, v 4 ml redestilované vody bylo rozmícháno 12,64 mg NADPH.
- Bylo smícháno 10 ml pufru a 34,3  $\mu$ l 70% t-butylhydroperoxidu.

Do mikrotitrační destičky GAMA bylo napipetováno 50  $\mu$ l biologické frakce a multikanálovou pipetou přidáno 130  $\mu$ l mastermixu. Pro přípravu mastermixu bylo smícháno: 10,8 ml pufru, 1,2 ml EDTA, 1,2 ml GR a 2,4 ml GSH.

Destička byla preinkubována v Thermomixeru Eppendorf 10 minut při 25 °C. Do destičky bylo napipetováno 10 µl NADPH a na přístroji Tecan byla 5 minut sledována spotřeba NADPH nezávislá na hydroperoxidu (slepý vzorek). Poté byla reakce nastartována přidáním 10 µl t-butylhydroperoxidu a znovu byla měřena absorbance při 340 nm po dobu 5 minut.

Pro výpočet aktivity byl využit vzorec:

$$\text{aktivita (U)} = \frac{(\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{bl}}) \times 2 \times V_i}{\epsilon \times l \times V_s}$$

$\epsilon$  = molární extinkční koeficient NADPH (6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

$\Delta A_{\text{vz}}$  – změna absorbance vzorku

$\Delta A_{\text{bl}}$  – změna absorbance blanku

l - výška reakční směsi v jamce

$V_i$  - objem reakční směsi

$V_s$  - objem biologické frakce

2 - vyplývá ze stechiometrie, 2 µmol GSH jsou produkovány 1 µmolem NADPH

#### 4.5.4 Stanovení aktivity glutathionreduktázy

Metoda je založena na reakci, při které se mění oxidovaný glutathion (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH). Při této reakci dochází rovněž k oxidaci NADPH. Spotřeba NADPH je sledována jako úbytek absorbance, což je měřeno spektrofotometricky při 340 nm (Bonilla et al., 2008; Carlberg et al., 1985).

Pro stanovení byly připraveny roztoky:

- 0,1 M K-fosfátový pufr
- 5 mM EDTA, v 5 ml redestilované vody bylo rozmícháno 9,3 mg EDTA.
- 2,5 mM NADPH, ve 2 ml redestilované vody bylo rozmícháno 4,6 mg NADPH.
- 4 mM GSSG, v 6 ml redestilované vody bylo rozmícháno 14,7 mg GSSG.

Před stanovením byl připraven master mix, byly pipetovány tyto objemy: 6 ml pufru, 4,8 ml EDTA, 6 ml GSSG a 1,2 ml NADPH. Z takto připraveného master mixu bylo pipetováno 150 µl multikanálovou pipetou.



Dále bylo po jednotlivých jamkách pipetováno 50  $\mu\text{l}$  biologické frakce. Na přístroji Tecan byla měřena absorbance při 340 nm v 6 cyklech po 1 minutě. Pro výpočet aktivity GR byl využit molární extinkční koeficient ( $\epsilon_{\text{NADPH}}=6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.5.5 Stanovení aktivity glutathion-S-transferázy

Měření aktivity GST je založeno na reakci glutathionu (GSH) a 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB). Vzniká konjugát S-2,4-dinitrofenylglutathion jehož absorpční maximum je měřeno při 340 nm. Je sledován přírůstek vznikajícího konjugátu za minutu (Ye a Zhang, 2001).

Pro stanovení GST byly připraveny roztoky:

- 0,1 M Na-fosfátový pufr, bylo naváženo 1,79 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a toto množství rozpuštěno v 50 ml redestilované vody. Dále naváženo 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  a rozpuštěno ve 100 ml redestilované vody. Oba roztoky byly pomocí pH metru smíchány na požadované pH 6,5.
- 5,15 mM GSH, roztok glutathionu byl připraven navážením 7,92 mg GSH, který byl rozpuštěn v 5 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru.
- 51,5 mM CDNB, naváženo 5,22 mg a toto množství bylo rozpuštěno v 0,5ml ethanolu.

Z výše uvedených roztoků byl před stanovením aktivity GSH vytvořen master mix, který obsahoval 4ml GSH, 0,4 ml CDNB a 15,6 ml 0,1 Na-fosfátového pufru. Do mikrotitrační destičky Greiner bylo napipetováno 6  $\mu\text{l}$  vzorku a multikanálovou pipetou přidáno 194  $\mu\text{l}$  master mixu. Jako slepý vzorek byl změřen Na-fosfátový pufr. Na přístroji Tecan byla měřena absorbance v 6 cyklech po 1 minutě při vlnové délce 340 nm. Pro výpočet byl využit molární extinkční koeficient ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

## 4.5.6 Stanovení aktivity peroxidázy

### 4.5.6.1 Metoda s pyrokatecholem a anilinem

Principem metody je reakce katalyzovaná peroxidázou, při které dochází k rozkladu peroxidu vodíku. Reakčním substrátem je dvojice pyrokatechol-anilin, tento komplex slouží jako vodíkový donor pro stanovení aktivity peroxidázy. Substrát pyrokatechol-anilin se v průběhu reakce mění na barevný produkt 4-(fenylamino)benzen-1,2-diol. Tento barevný produkt, respektive přírůstek koncentrace produktu, je měřen spektrofotometricky při 510 nm. (*Molaei et al., 2007*)

Pro reakci bylo využito těchto roztoků:

- 0,2M Na-fosfátový pufr (pH=7,0), bylo naváženo 35,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a rozpuštěno v 500 ml redestilované vody, dále bylo naváženo 7,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a rozpuštěno ve 250 ml redestilované vody, oba roztoky byly smíchány při kontrole na pH metru na požadované pH 7,0.
- 1,7mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , do 20 ml 0,2 M sodno-fosfátového pufru bylo napipetováno 3,87  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- substrát pyrokatechol-anilin, v 10 ml 0,2 M sodno-fosfátového pufru bylo rozpuštěno 0,1872g pyrokatecholu (170mM) a 2,28  $\mu\text{l}$  anilinu (2,5mM).

Do mikrotitrační destičky GAMA bylo multikanálovou pipetou napipetováno 90  $\mu\text{l}$  substrátu a 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  a destička byla preinkubována v Thermomixeru 4 min při 25°C. Po preinkubaci bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  biologické frakce. Jako slepý vzorek byl použit pufr. Na přístroji Tecan byl měřen přírůstek barevného produktu při 510 nm během 6 cyklů po 1 minutě. Po výpočet aktivity byl využit molární extinkční koeficient 4-(fenylamino)benzen-1,2 diolu ( $\epsilon = 5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### 4.5.6.2 Metoda s guajakolem

Metoda je založená na reakci, při které je peroxid vodíku, za přítomnosti guajakolu a peroxidázy rozkládán na kyslík a vodu. Uvolněný kyslík oxiduje guajakol na žlutohnědý 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylichinon. Tato změna bezbarvého guajakolu na barevný produkt se projeví změnou absorpance při 420 nm (*Drotar et al., 1985*).

Pro stanovení bylo využito těchto roztoků:

- 50mM TRIS/HCl (pH = 6,0), pro přípravu tohoto pufru bylo naváženo 1,5143 g TRIS a rozpuštěno ve 250 ml redestilované vody, při kontrole na pH metru.
- 3,4 mM guajakol, do 100 ml redestilované vody bylo napipetováno 38  $\mu$ l guajakolu.
- 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do 10 ml 50 mM pufru bylo napipetováno 9  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Před měřením aktivity byla připravena reakční směs, která se skládala z: 27 ml 50mM TRIS/HCl pufru; 600  $\mu$ l 3,4 mM guajakolu a 600  $\mu$ l 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Do mikrotitrační destičky GAMA bylo pipetováno multikanálovou pipetou 190  $\mu$ l reakční směsi a 10  $\mu$ l biologické frakce. Jako slepý vzorek byl použit TRIS/HCl pufr. Na přístroji Tecan byla měřena změna absorbance při 420 nm. Pro výpočet aktivity byl použit molární extinkční koeficient guajakolu ( $\epsilon_{\text{guajakol}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.5.7 Stanovení aktivity superoxidodismutázy

Principem metody je vznik rozpustného formazanového barviva z tetrazoliové soli WST-1, redukcí superoxidových aniontů generovaných xantinoxidázou. Rychlost reakce je přímo úměrná aktivitě xantinoxidázy a je inhibována SOD, která rozkládá superoxidové anionty na kyslík a peroxid vodíku.

Pro stanovení aktivity SOD byl využit SOD Assay Kit-WST, který obsahoval tyto roztoky:

- WST
- EWS – (enzymový roztok)
- pufr na ředění
- pufrovací roztok

WST pracovní roztok byl připraven z 1 ml WST a 19 ml pufrovacího roztoku. EWS enzymový pracovní roztok byl připraven smícháním 15  $\mu$ l roztoku enzymu a 2,5 ml pufru na ředění.

**Tabulka 6: Metodika stanovení SOD na mikrotitrační destičce GAMA**

	vzorek (μl)	blank 1 (μl)	blank 2 (μl)	blank 3 (μl)
<b>biologická frakce</b>	20		20	
<b>redestilovaná voda</b>		20		20
<b>WST</b>	200	200	200	200
<b>EWS</b>	20	20		
<b>pufř na ředění</b>			20	20

Objemy uvedené v tabulce 6 byly kromě vzorků napipetovány multikanálovou pipetou do mikrotitrační destičky GAMA s vypouklým dnem. Vzorky byly napipetovány jednotlivě do jamek pipetou. Destička byla inkubována po dobu 20 minut v Thermomixeru při teplotě 25°C.

Vzorec pro výpočet koncentrace substrátu:

$$C = \frac{(\Delta A_{BL1} - \Delta A_{BL3}) - (\Delta A_{VZ} - \Delta A_{BL3})}{\epsilon \times l}$$

Výsledná koncentrace byla použita pro výpočet enzymové aktivity podle vzorce:

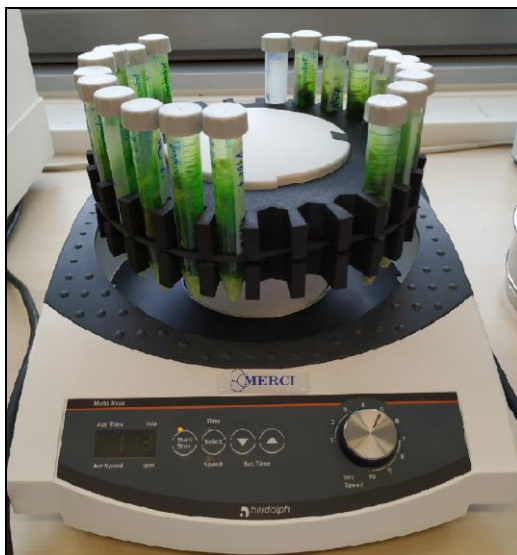
$$\text{aktivita (U)} = \frac{C \times V \times 50 \times 10^9}{t}$$

## **4.6 Stanovení koncentrace chlorofylů a karotenoidů**

### **4.6.1 Extrakce do methanolu**

Listy vojtěšky seté byly nastříhány a zváženy na analytických vahách. Jednotlivé navážky byly zapsány a s těmito hodnotami bylo dále pracováno při výpočtech koncentrací. Následně byly listy přeneseny do zkumavek typu Falcon. Jako extrakční roztok byl použit 100% methanol. Do zkumavek bylo napipetováno 10 ml 100% methanolu a byly přidány homogenizační keramické kuličky. Zkumavky se vzorky byly homogenizovány v homogenizátoru MP Fast Prep, ve dvou cyklech po dobu 40 sekund.

Následně byly vzorky pomocí třepačky Heidolph Multi Reax extrahovány po dobu 120 minut na rychlosti 5 (Obr. 9). Po uplynutí potřebné doby k extrakci byly vzorky centrifugovány. Po centrifugaci byl odsát supernatant, ve kterém byla měřena absorbance (Lichtenthaler, 1987; Lichtenthaler a Buschmann, 2001).



**Obrázek 9: Extrakce chlorofylů a karotenoidů do methanolu**

#### 4.6.2 Stanovení koncentrace chlorofylů a karotenoidů

Pro spektrofotometrické stanovení chlorofylů v UV-VIS oblasti se využívá specifických vlnových délek uvedených v tabulce 7.

**Tabulka 7: Vlnové délky (nm) pro stanovení fotosyntetických pigmentů**

vlnová délka (nm)	fotosyntetické pigmenty
470	karotenoidy
652,4	chlorofyl B
665,2	chlorofyl A

Supernatant vzorků byl měřen v kyvetách z křemenného skla o optické délce 1 cm, při vlnových délkách uvedených v tabulce 7, jako slepý vzorek byl použit 100% methanol.

Vzorce pro výpočet koncentrace chlorofylů a karotenoidů:

$$\text{koncentrace chlorofylu A } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = 16,72 \times A_{665,2} - 9,16 \times A_{652,4}$$

$$\text{koncentrace chlorofylu B } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = 34,09 \times A_{652,4} - 15,28 \times A_{665,2}$$

$$\text{celková koncentrace chlorofylů } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = 1,44 A_{665,2} + 24,93 A_{652,4}$$

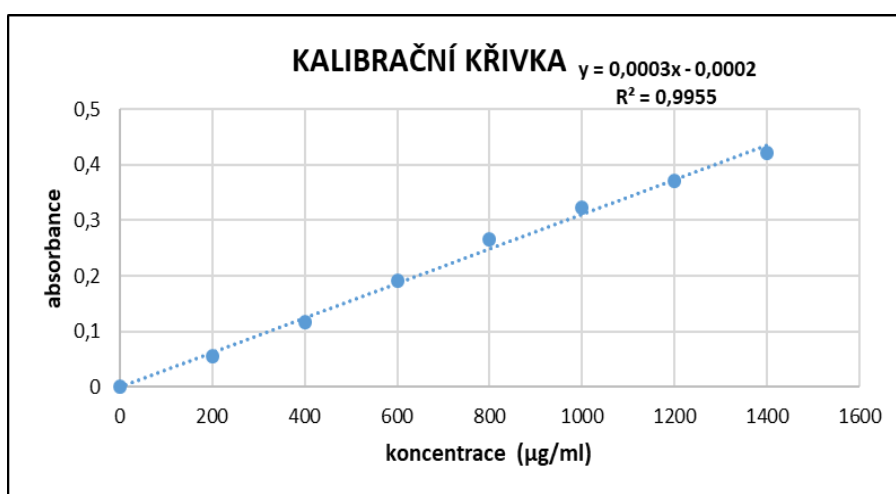
$$\text{koncentrace karotenoidů } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \frac{1000 A_{470} - 1,63 C_A - 104,96 C_B}{221}$$

Vypočítaná koncentrace byla uvedena v jednotkách mg/ml, bylo tedy nutno provést přepočítání, kdy je výsledná koncentrace uvedena v jednotkách mg·g<sup>-1</sup>, tzn. množství chlorofylů ku hmotnosti čerstvých listů vojtěšky (*Lichtenthaler a Buschmann, 2001*).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Koncentrace bílkovin

Koncentrace bílkoviny v rostlinných vzorcích byla stanovena dle kapitoly 4.4. Z hodnot absorbance standardů byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 10) vyjadřující závislost absorbance na koncentraci bílkoviny. Každý bod představuje zprůměrované hodnoty absorbance získané z 3 nezávislých měření. Výsledná kalibrační křivka byla doplněna o rovnici lineární regrese. Rovnice byla použita pro výpočet koncentrace bílkovin jednotlivých vzorků.



**Obrázek 10: Kalibrační křivka standardů BSA**

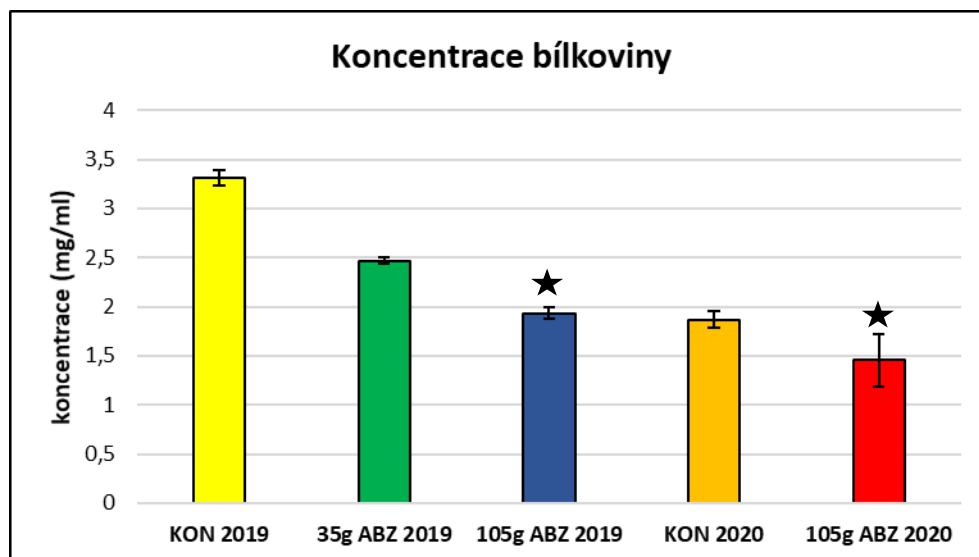
Měření bílkoviny a následné sestavení kalibrační křivky, bylo provedeno pro každou skupinu rostlin zvlášť. Koncentrace bílkovin byla využita pro výpočty specifických aktivit studovaných enzymů. V tabulce 9 jsou uvedeny výsledné koncentrace bílkovin ve vzorcích rostlin z roku 2019 i 2020.

**Tabulka 8: Koncentrace bílkovin ve vzorcích vojtěšky seté**

	2019 protein (mg/ml)	2020 protein (mg/ml)
<b>KON</b>	3,31 ± 0,08	1,87 ± 0,08
<b>35gABZ</b>	2,46 ± 0,03	-
<b>105gABZ</b>	1,93 ± 0,06*	1,45 ± 0,26*

\* Statisticky ( $p < 0,05$ ) významný rozdíl oproti kontrole

Obr. 11 znázorňuje výsledné koncentrace bílkovin ve vzorcích vojtěšky seté. U rostlin v roce 2019 byla koncentrace bílkovin stanovena ve vzorcích kontrolních (KON) a vzorcích ovlivněných albendazolem (35g ABZ a 105g ABZ). U rostlin z roku 2020 byla koncentrace bílkovin měřena u vzorků kontrolních (KON) a ovlivněných 105g ABZ.



**Obrázek 11: Koncentrace bílkovin ve vzorcích vojtěšky seté**  
 \* Statisticky ( $p < 0,05$ ) významné rozdíly ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům

U vzorků z roku 2019 byla naměřena vyšší koncentrace bílkovin než u vzorků 2020. Ve vzorcích 2019 je patrný signifikantní pokles koncentrace bílkovin u vzorků 105g ABZ vůči kontrole. U vzorků 35g ABZ 2019 byla také naměřena nižší koncentrace bílkovin oproti kontrolním vzorkům. Tento pokles však nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. U vzorků 2020 je statisticky významně nižší koncentrace bílkovin u vzorků 105g ABZ ve srovnání s kontrolou.

U vzorků v obou letech 2019 i 2020 je patrný stejný trend, a to klesající koncentrace bílkovin ve vzorcích ovlivněných albendazolem oproti kontrolním vzorkům.

## 5.2 Ovlivnění aktivity antioxidantních enzymů albendazolem

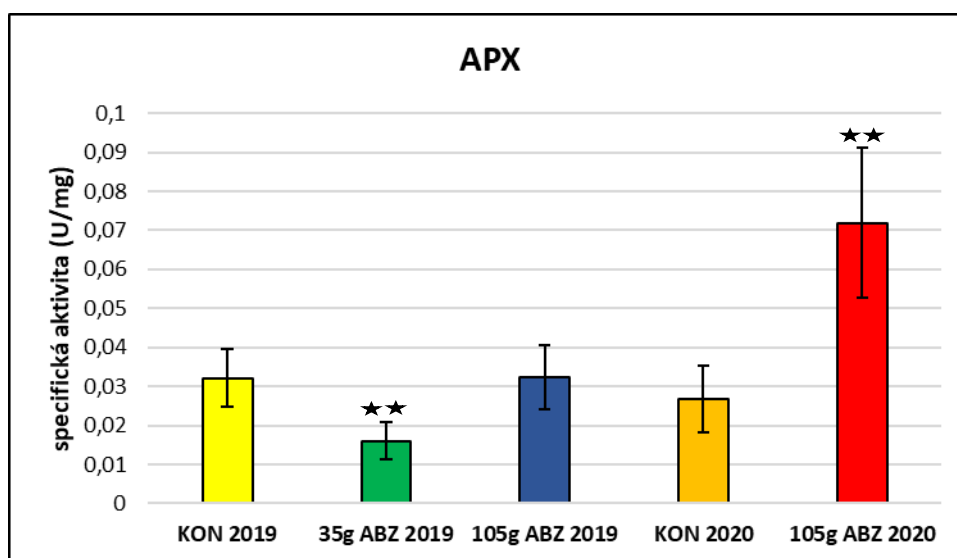
Grafy uvedené v této kapitole znázorňují naměřené specifické aktivity studovaných antioxidantních enzymů. Každý sloupec grafu představuje zprůměrovanou specifickou aktivitu (U/mg) enzymu získanou ze 3 na sobě nezávislých měření.



Ovlivněné vzorky (35g ABZ a 105g ABZ) byly porovnány oproti kontrolní skupině vzorků KON, což jsou vzorky, které nebyly ovlivněny albendazolem.

Byly stanoveny 2 hladiny statistické významnosti a pro statistické zpracování byl použit nepárový t-test s Welchovou korekcí. Hvězdičkou byly označeny ty vzorky, u kterých došlo k signifikantní změně specifické aktivity proti kontrole.

### 5.2.1 Ovlivnění aktivity askorbátperoxidázy albendazolem



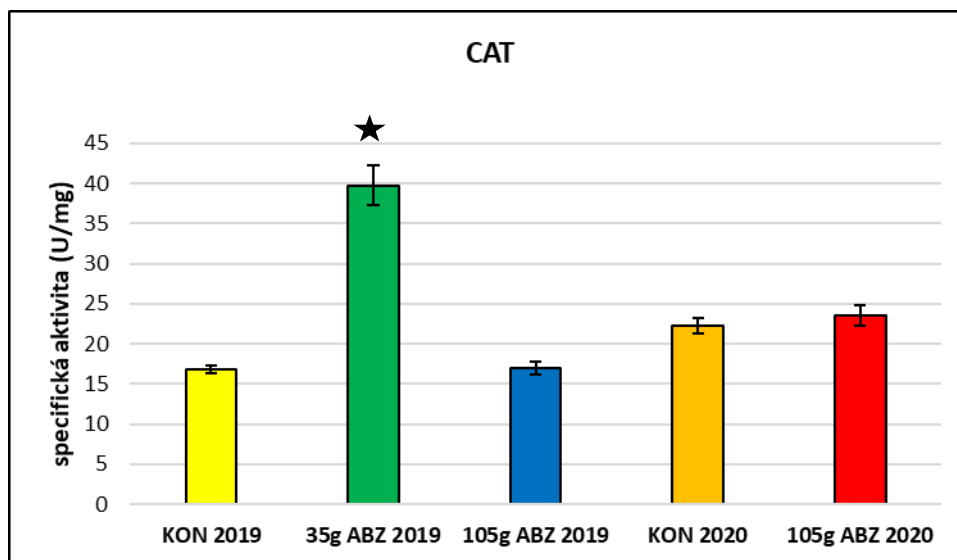
**Obrázek 12: Specifická aktivita APX v kontrolních rostlinách vojtěšky seté a v rostlinách ovlivněných ABZ (35g ABZ a 105g ABZ)**

**\*\* Statisticky ( $p < 0,01$ ) významné rozdíly ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům**

U rostlin v obou letech 2019 i 2020 došlo k statisticky významnému ovlivnění specifické aktivity APX albendazolem. Ve várce 2019 byla zaznamenána signifikantně nižší aktivita u vzorků 35gABZ oproti kontrolním vzorkům. Ovlivněná skupina vzorků 105gABZ 2019 vykazovala téměř stejnou aktivitu jako vzorky neovlivněné albendazolem. U vzorků 2020 došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity u vzorků ovlivněných albendazolem, u těchto vzorků byla naměřena nejvyšší aktivita APX.

## 5.2.2 Ovlivnění aktivity katalázy albedazolem

Aktivita katalázy byla stanovena ve vzorcích 2019 i 2020 dvěma metodami: metodou, kde byl jako substrát kromě peroxidu vodíku využit i molybdenan amonný. A metodou, kde docházelo ke štěpení peroxidu vodíku působením katalázy a jeho úbytek se měřil přímo.



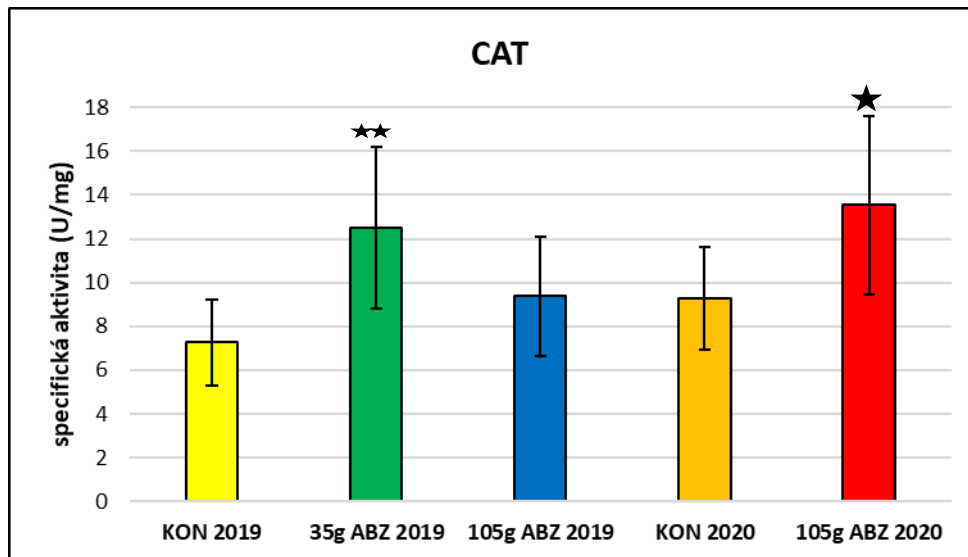
**Obrázek 12: Specifická aktivita CAT stanovená metodou s  $H_2O_2$  a molybdenanem amonným v kontrolních rostlinách vojtěšky seté a v rostlinách ovlivněných ABZ (35g ABZ a 105g ABZ)**

\* Statisticky ( $p < 0,05$ ) významné rozdíly ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům

U vojtěšky v roce 2019 byl zaznamenán signifikantní nárůst aktivity pouze u vzorků 35g ABZ, u těchto vzorků byla detekována nejvyšší aktivita CAT. U vzorků 105g ABZ došlo k mírnému zvýšení aktivity CAT, toto zvýšení není signifikantní.

U vzorků 2020 byla detekována vyšší aktivita CAT než u vzorků 2019. Oproti kontrolním vzorkům byla detekována vyšší aktivita CAT ve vzorcích 105g ABZ, tento nárůst nebyl vyhodnocen jako statisticky významný.

U vzorků 2019 i 2020 byla shodně naměřena metodou s molybdenanem amonným vyšší aktivita CAT u vzorků ovlivněných ABZ oproti vzorkům kontrolním.



**Obrázek 13: Specifická aktivita CAT stanovená metodou s  $H_2O_2$  v kontrolních rostlinách vojtěšky seté a v rostlinách ovlivněných ABZ (35g ABZ a 105g ABZ)**  
 Statisticky (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) významné rozdíly ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům

U vzorků 35g ABZ 2019 došlo ke statisticky významnému nárůstu aktivity CAT ve srovnání s kontrolou, u vzorků 105g ABZ je taktéž viditelný nárůst aktivity, tento však není signifikantní. U vzorků vojtěšky z roku 2020 je patrný signifikantní nárůst aktivity u vzorků ovlivněných ABZ oproti kontrolní skupině vzorků.

Jak metodou s  $H_2O_2$  a molybdenanem amonným, tak metodou pouze s peroxidem vodíku byla naměřena signifikantně vyšší aktivita u vzorků 35g ABZ 2019 oproti kontrolním vzorkům. Taktéž u vzorků 105g ABZ 2019 je sledován stejný trend, a to mírné zvýšení specifické aktivity CAT u obou metod detekce. Vzorky 2019 měřené metodou s molybdenanem amonným vykazují vyšší aktivitu než tytéž vzorky měřené metodou pouze s  $H_2O_2$ . Vzorky várky 2020 vykazují stejný trend v ovlivnění aktivity CAT. Jak u metody s molybdenanem amonným, tak u metody s peroxidem vodíku došlo k nárůstu specifické aktivity CAT u vzorků 105g ABZ. Rozdílem je statistická významnost zvýšení aktivity. U metody s  $H_2O_2$  došlo k statisticky významnému zvýšení aktivity CAT, metodou s  $H_2O_2$  a molybdenanem amonným tento nárůst nebyl vyhodnocen jako signifikantní.

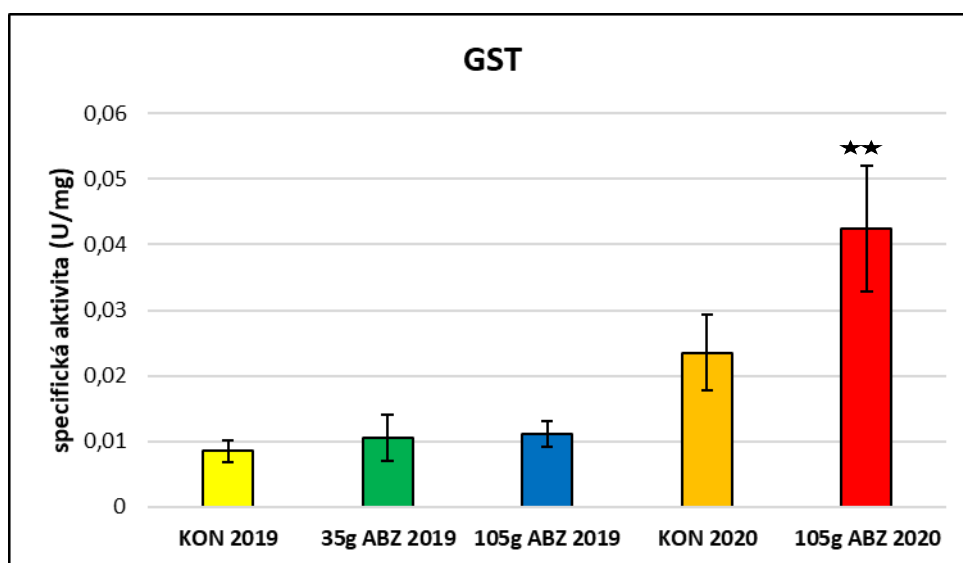
### 5.2.3 Ovlivnění aktivity glutathionperoxidázy albendazolem

V subcelulárních frakcích vojtěšky 2019 nebyla detekována aktivita GPX. Stejná situace nastala při měření aktivity GPX u vzorků vojtěšky 2020. I v tomto případě nebyla detekována aktivita GPX. Pro kontrolu metody bylo provedeno měření aktivity GPX v cytosolu potkana. V jaterních vzorcích potkana byla detekována aktivita GPX. Tím bylo potvrzeno, že nedošlo k metodické chybě.

### 5.2.4 Ovlivnění aktivity glutathionreduktázy albendazolem

Aktivita GR nebyla detekována ani v jedné várce rostlin, z tohoto důvodu byla provedena kontrola metody s cytosolem potkana. V cytosolu potkana byla, na rozdíl od subcelulárních frakcí vojtěšky, naměřena aktivita GR. Tím bylo potvrzeno, že nedošlo k metodické chybě.

### 5.2.5 Ovlivnění aktivity glutathion-S-transferázy albendazolem



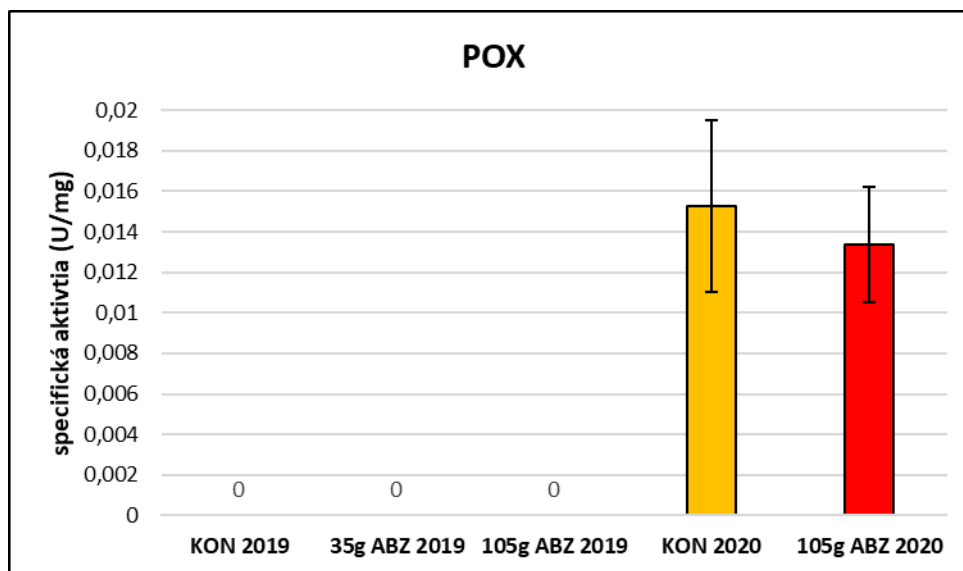
**Obrázek 14: Specifická aktivita GST v kontrolních rostlinách vojtěšky seté a v rostlinách ovlivněných ABZ (35g ABZ a 105g ABZ)**

**\*\* Statisticky ( $p < 0,01$ ) významné rozdíly ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům**

Z grafu 14 je patrné, že u první skupiny rostlin z roku 2019 došlo k mírnému zvýšení aktivity u vzorků ovlivněných ABZ, tedy 35g ABZ a 105g ABZ. Tento nárůst však není statisticky významný. U skupiny vzorků 2020 došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity GST u vzorků 105g ABZ oproti kontrolní skupině vzorků.

## 5.2.6 Ovlivnění aktivity peroxidázy alabendazolem

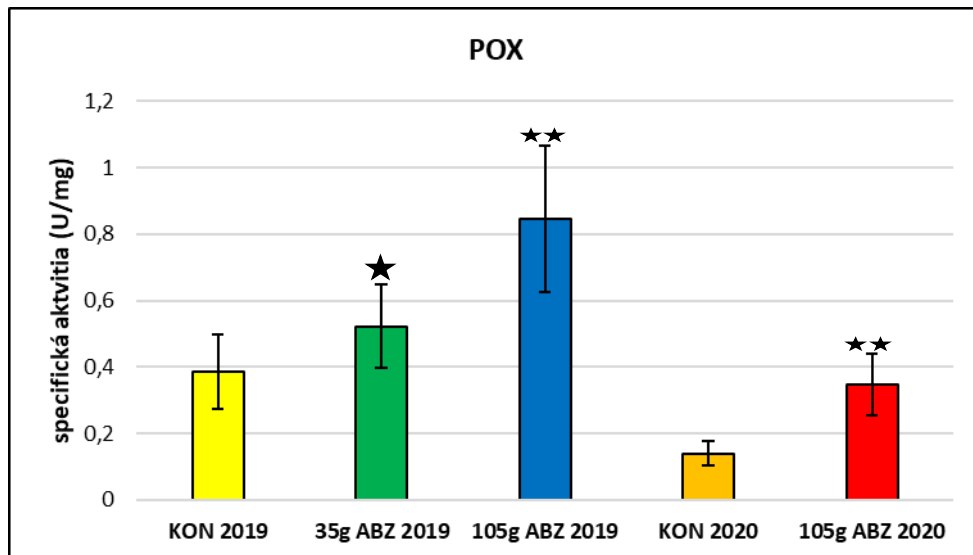
Aktivita POX byla detekována u obou skupin rostlin, 2019 i 2020 dvěma metodami. A to metodou s guajakolem a metodou s pyrokatecholem.



**Obrázek 15: Specifická aktivita POX stanovená metodou s guajakolem v kontrolních rostlinách vojtěšky seté a v rostlinách ovlivněných ABZ (35g ABZ a 105g ABZ)**

U vojtěšky sklizené v roce 2019 nebyla metodou s guajakolem detekována v žádném ze 3 měření aktivita POX.

U rostlin z roku 2020 byla naměřena nízká aktivita POX metodou s guajakolem. U vzorků 105g ABZ došlo ke snížení aktivity oproti kontrolním vzorkům. Toto snížení aktivity však nebylo vyhodnoceno jako signifikantní.



**Obrázek 16: Specifická aktivita POX (metoda s pyrokatecholem) v kontrolních rostlinách vojtěšky seté a v rostlinách ovlivněných ABZ (35g ABZ a 105g ABZ)**  
 Statisticky (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) významné rozdíly ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům

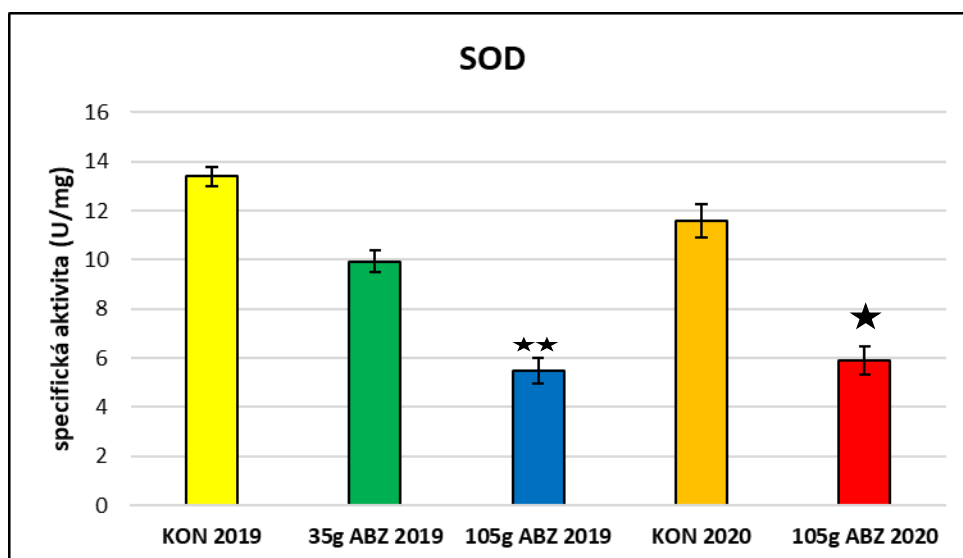
U vzorků vojtěšky 2019 došlo k signifikantní změně specifické aktivity u rostlin ovlivněných albendazolem. Nárůst aktivity byl zaznamenán jak u vzorků 35g ABZ, tak i vzorků 105g ABZ. U vzorků 105g ABZ byla detekována nejvyšší specifická aktivita POX.

U vzorků 2020 došlo taktéž k nárůstu aktivity u vzorků 105g ABZ, i v tomto případě se jedná o statisticky významné zvýšení specifické aktivity POX.

I když byla u várky 2020 detekována nižší aktivita POX oproti vzorkům 2019, lze pozorovat stejný trend nárůstu aktivity. Jak u várky 2019 tak i 2020 došlo k signifikantnímu zvýšení specifické aktivity POX u rostlin ovlivněných albendazolem.

Vzhledem k tomu, že aktivita POX nebyla u rostlin z roku 2019 metodou s guajakolem detekována, lze srovnat obě metody stanovení aktivity POX pouze u vzorků z roku 2020. Je vidět, že nárůst aktivity u vzorků ovlivněných 105g ABZ detekovaný metodou s pyrokatecholem nebyl metodou s guajakolem zaznamenán.

## 5.2.7 Ovlivnění aktivity superoxidodismutázy albendazolem



**Obrázek 17: Specifická aktivita SOD v kontrolních rostlinách vojtěšky seté a v rostlinách ovlivněných ABZ (35g ABZ a 105g ABZ)**

Statisticky (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) významné rozdíly ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům

U vzorků 2019 je patrný pokles specifické aktivity SOD u vzorků ovlivněných ABZ. Došlo k poklesu aktivity SOD u vzorků 35g ABZ, tento pokles však není statisticky významný. Pokles aktivity u vzorků 105g ABZ byl vyhodnocen jako signifikantní. U vzorků 2020 došlo taktéž k signifikantnímu poklesu specifické aktivity SOD u vzorků 105g ABZ oproti kontrolním vzorkům.

U vzorků 2019 i 2020 byl zaznamenán stejný trend poklesu aktivity. U rostlin vojtěšky ovlivněných ABZ byla shodně v obou rocích zaznamenána signifikantně nižší aktivita SOD oproti vzorkům kontrolním.

### 5.3 Přehled aktivity antioxidačních enzymů vojtěšky v roce 2019 a 2020

V tabulce 10 je uveden přehled naměřených specifických aktivit studovaných antioxidačních enzymů kontrolní a albendazolem ovlivněné vojtěšky pěstované v roce 2019 a 2020.

**Tabulka 9: Přehled specifických aktivit u sledovaných antioxidačních enzymů**

	KON (U/mg)		35gABZ (U/mg)	105gABZ (U/mg)	
	2019	2020	2019	2019	2020
<b>APX</b>	0,032 ± 0,007	0,026 ± 0,009	0,016 ± 0,005**	0,032 ± 0,008	0,071 ± 0,019**
<b>CAT<sub>mol.</sub></b>	16,78 ± 0,47	22,25 ± 0,98	39,75 ± 2,40*	16,94 ± 0,76	23,54 ± 1,31
<b>CAT<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub></b>	7,26 ± 1,98	9,26 ± 2,33	12,50 ± 3,72**	9,37 ± 2,71	13,54 ± 4,08*
<b>GPX</b>	nd	nd	nd	nd	nd
<b>GR</b>	nd	nd	nd	nd	nd
<b>GST</b>	0,009 ± 0,002	0,043 ± 0,011	0,010 ± 0,003	0,011 ± 0,002	0,061 ± 0,013**
<b>POX<sub>guaj</sub></b>	nd	0,015 ± 0,004	nd	nd	0,013 ± 0,003
<b>POX<sub>pyro</sub></b>	0,39 ± 0,12	0,14 ± 0,04	0,52 ± 0,13*	0,85 ± 0,22**	0,35 ± 0,09**
<b>SOD</b>	13,40 ± 0,40	11,59 ± 0,65	9,94 ± 0,44	5,49 ± 0,53**	5,91 ± 0,58*

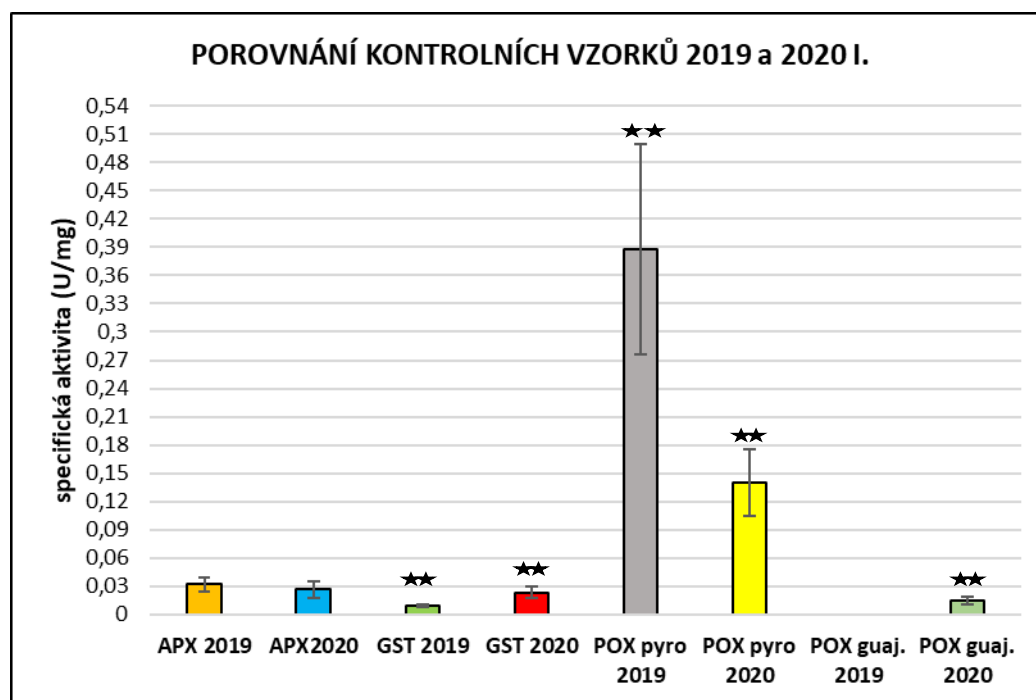
\* statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p < 0,05$ ); \*\* statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p < 0,01$ ); nd – aktivita nebyla nalezena

U obou skupin rostlin, 2019 i 2020, byla naměřena nejvyšší aktivita u enzymu CAT metodou s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a molybdenanem amonným. Nejnižší aktivita byla naměřena v subcelulárních frakcích rostlin z roku 2019 u enzymu GST. U enzymů GPX a GR nebyla detekovaná aktivita jak v subcelulárních frakcích várky 2019, tak i vzorcích 2020.



## 5.4 Meziroční porovnání antioxidantních enzymů vojtěšky

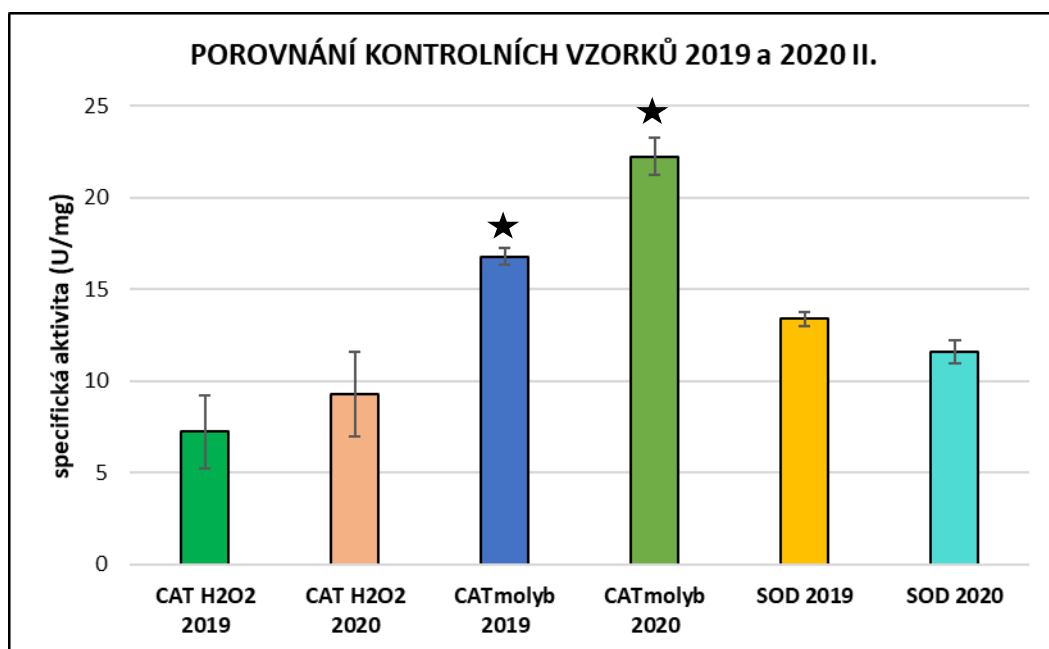
Grafy 18 a 19 obsahují porovnání specifických aktivit kontrolních vzorků vojtěšky seté, tedy rostlin neovlivněných alendazolem. Byly porovnány vzorky KON mezi várkami 2019 a 2020. Vzorky, které měly meziročně statisticky významnou změnu aktivity, byly označeny hvězdičkou.



**Obrázek 18: Porovnání specifických aktivit antioxidantních enzymů kontrolních rostlin vojtěšky mezi roky 2019 a 2020 I.**

**\*\*** statisticky významný rozdíl mezi rokem 2019 a 2020 ( $p < 0,01$ )

V grafu 18 jsou znázorněny kontrolní vzorky 2019 a 2020, u kterých byla naměřena specifická aktivita antioxidantních enzymů menší než 1,0 U/mg. V této skupině enzymů byl patrný statisticky významný rozdíl mezi várkami rostlin 2019 a 2020. U enzymu GST došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity u vzorků 2020 oproti vzorkům 2019. U kontrolních vzorků 2019 byla u enzymu GST změřena nejnižší specifická aktivita oproti ostatním aktivitám vybraných antioxidantních enzymů. U enzymu POX měřené metodou s pyrokatecholem, došlo u kontrolních vzorků 2020 ke statisticky významnému poklesu specifické aktivity oproti vzorkům KON 2019. Ve vzorcích 2019 nebyla detekována aktivita POX metodou s guajakolem, u várky 2020 došlo k naměření specifické aktivity POX výše zmíněnou metodou. Rozdíly ve specifických aktivitách kontrolních vzorků nebyly zaznamenány u enzymu APX.



**Obrázek 19: Porovnání specifických aktivit antioxidantních enzymů kontrolních rostlin vojtěšky mezi roky 2019 a 2020 II.**

*\* statisticky významný rozdíl mezi rokem 2019 a 2020 ( $p < 0,05$ )*

V grafu 19 jsou pro porovnání uvedeny kontrolní vzorky 2019 a 2020, u kterých byla naměřena specifická aktivita větší než 1,0 U/mg. Největší rozdíl aktivit kontrolních rostlin mezi oběma roky je dle grafického znázornění patrný u enzymu CAT ( $p < 0,05$ ; stanovení aktivity metodou s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a molybdenanem amonným). Ve vzorcích 2020 je patrný signifikantní nárůst aktivity CAT metodou s peroxidem vodíku oproti vzorkům 2019. Tento rozdíl však není statisticky ( $p < 0,05$ ) významný, z důvodu vysokých hodnot směrodatných odchylek. U vzorků 2020 došlo k poklesu aktivity SOD oproti kontrolním vzorkům SOD 2019, tento rozdíl specifických aktivit nebyl vyhodnocen jako signifikantní.

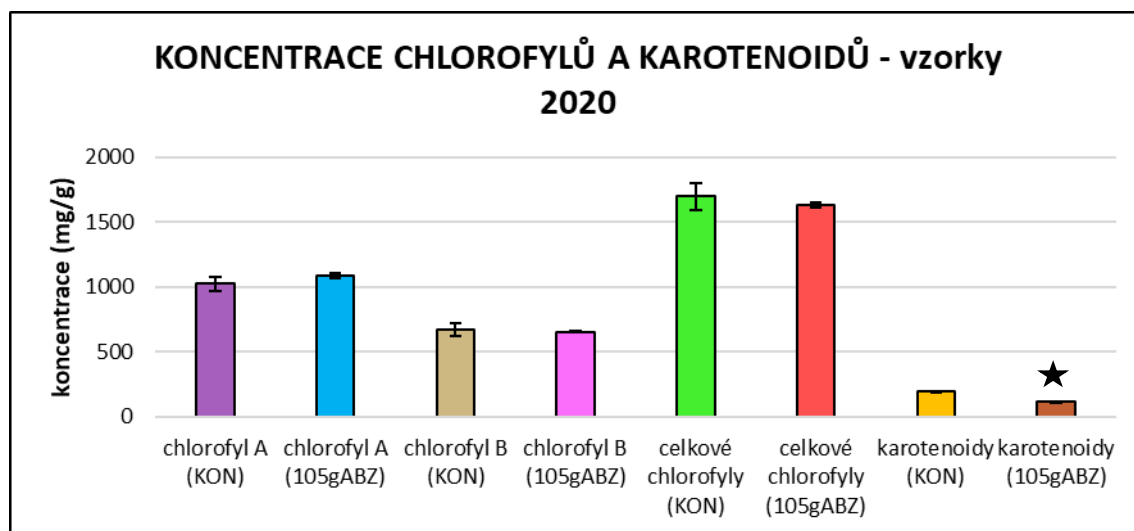
## 5.5 Koncentrace chlorofylů a karotenoidů

Koncentrace chlorofylů byla měřena v rostlinách vojtěšky seté, sklizené v roce 2020. Z listů těchto rostlin byly fotosyntetické pigmenty extrahovány do metanolu, metodika je blíže popsána v kapitole 4.6. Ze změřených absorbancí byla pomocí specifických vzorců vypočtena koncentrace studovaných neenzymatických antioxidantů (Lichtenthaler a Buschmann, 2001). Výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce 11 a znázorněny v grafu 20.

**Tabulka 10: Koncentrace chlorofylů a karotenoidů ve vzorcích vojtěšky 2020**

	KON (mg/g)	105g ABZ (mg/g)
<b>chlorofyl A</b>	1024,04 ± 54,73	1089,10 ± 14,45
<b>chlorofyl B</b>	671,58 ± 49,19	653,13 ± 5,58
<b>celkové chlorofyly</b>	1669,63 ± 103,89	1630,01 ± 21,28
<b>karotenoidy</b>	196,05 ± 1,12	112,84 ± 5,88 *

\* statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p < 0,05$ )



**Obrázek 10: Koncentrace chlorofylů a karotenoidů ve vzorcích vojtěšky 2020**

\* statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou

Porovnání koncentrace chlorofylů bylo provedeno u vzorků 105g ABZ 2020 oproti kontrolním vzorkům KON 2020. Statisticky významné ( $p < 0,05$ ) změny koncentrace jsou označeny hvězdičkou.

U chlorofylu A došlo u vzorků 105g ABZ k nárůstu koncentrace, toto zvýšení koncentrace však není statisticky významné. U chlorofylu B byla změřena prakticky stejná koncentrace u vzorků kontrolních i ovlivněných albendazolem. Celkové chlorofyly u vzorků 105g ABZ byly mírně sníženy, ale tento pokles nebyl vyhodnocen jako statisticky významný.

Jediná signifikantní změna v koncentracích fotosyntetických pigmentů byla detekovaná u karotenoidů. U vzorků 105g ABZ byla naměřena statisticky významně nižší koncentrace karotenoidů oproti vzorkům kontrolním.

**Tabulka 11: Poměry světlosběrných pigmentů**

indikátor		KON	105g ABZ
<b>funkční fotosyntetický aparát</b>	chl A/chl B	1,53	1,66
<b>stres</b>	chl A+chl B/karot.	8,65	14,44

*chl A – chlorofyl A; chl B – chlorofyl B; karot. – karotenoidy*

V tabulce 12 jsou uvedeny výsledky poměrů koncentrace chlorofylů a karotenoidů. Tyto poměry jsou ukazatelé funkčního fotosyntetického aparátu rostlin. Proběhlo porovnání výsledků vzorků 105g ABZ ke kontrolním vzorkům KON, neovlivněných anthelmintikem.

U ovlivněných vzorků albendazolem došlo u obou sledovaných poměrů ke zvýšení hodnot, oproti kontrolní skupině vzorků.

## 6. DISKUZE

Do životního prostředí vstupuje široká škála veterinárních přípravků, především antibiotika, antiflogistika, antiparazitika, hormony, protizánětlivé léky, anestetika a v neposlední řadě také anthelmintika. Tato léčiva představují významný zdroj znečištění a výrazné riziko pro necílové organismy, mezi které patří rostliny (Bártíková et al., 2016; Domke et al., 2011). Informací o fytotoxicitě anthelmintik není mnoho. Větší pozornost byla věnována jiným druhům veterinárních přípravků, především byla studována enviromentální rizika antibiotických preparátů. Je popsán efekt antibiotických preparátů na půdní faunu (Bauer et al., 2000) a vstup antibiotik do povrchových a podzemních vod (Ben et al., 2013).

Na vojtěšce seté (*Medicago sativa*) byl studován toxický efekt antibiotika sulfamethazinu (Kurwadkar et al., 2017), fytotoxický účinek na růst kořenů vojtěšky měl oxytetracyklin (Kong et al. 2007) a na klíčení semen a růst vojtěšky jako nejvíce toxická antibiotika byly vyhodnoceny chlortetracyklin, levofloxacin a sulfamethoxazol (Hills et al. 2011).

V této práci byl jako modelové anthelmintikum zvolen albendazol (ABZ), zástupce benzimidazolových preparátů. Jedná se o širokospektrý veterinární přípravek využívaný především u ovcí a skotu. Studie byla prováděna na vojtěšce seté (*Medicago sativa*), zemědělsky významné pícnině. Cílem studie bylo posouzení vlivu albendazolu, pocházejícího z trusu léčených ovcí, na antioxidační systém vojtěšky seté pěstované v reálných podmínkách.

Biotransformace ABZ byla popsána u rostlinných regenerantů jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*), zvonku okrouhlolistého (*Campanula rotundifolia*), rákosu obecného (*Phragmites australis*) a vojtěšky seté (*Medicago sativa*). U všech těchto rostlin byla prokázána schopnost biotransformovat ABZ a celkem bylo nalezeno 37 různých metabolitů tohoto anthelmintika. Počet metabolitů se však u jednotlivých rostlinných druhů lišil (Podlipná et al., 2013; Stuchlíková et al., 2017; Stuchlíková et al., 2016; Stuchlíková et al., 2020).

Albendazol byl také testován pro potencionální toxicitu na klíčivost semen hořčice seté. Výsledky nepotvrdily vliv ABZ na klíčivost semen, což ale nijak nesnižuje potencionální environmentální riziko ABZ (Prchal et al., 2016).

Vojtěška byla pěstována na poli v roce 2019 a 2020, vždy kontrolní rostliny a rostliny ovlivněné ABZ. Kontrolní skupina rostlin byla hnojena 35g trusu od ovcí, neléčených albendazolem. Trus ovcí léčených ABZ byl aplikován v dávce 35g a 105g k centrálním rostlinám. Ve 35g trusu bylo 14  $\mu\text{g}$  ABZ, ve 105g trusu pak 42  $\mu\text{g}$  ABZ. První částí práce bylo stanovení koncentrace proteinů u skupiny rostlin sklizených v roce 2019 (KON, 35g ABZ, 105g ABZ) a v roce 2020 (KON, 105g ABZ). U obou skupin rostlin byla detekována signifikantně nižší koncentrace proteinů u rostlin ovlivněných 105 g trusu s obsahem ABZ 42  $\mu\text{g}$ . U skupiny vzorků 35g ABZ 2019 byla také detekována nižší koncentrace oproti vzorkům kontrolním, pokles nebyl signifikantní.

Nováková (2020) ve své diplomové práci popsala signifikantní zvýšení koncentrace proteinů v kořenech rostlin vojtěšky ovlivněné albendazolem. V nadzemní části rostliny (listech) nebyla detekována změna koncentrace proteinů oproti kontrolní skupině rostlin. Její experiment ale probíhal *in vitro* a rostlinné regeneranty byly anthelmintikem ovlivněny v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , kratší dobu (1 týden). V naší studii byly rostliny vystaveny účinkům ABZ delší dobu a koncentrace proteinů byla měřena až po sklizni, tj 3 měsíce od aplikace trusu k rostlinám. Koncentrace proteinů se mění v závislosti na typu a kombinaci stresoru a také na čase expozice, po kterou je rostlina stresoru vystavena. Long et al. (2016) zkoumal vliv zasolení půdy na koncentraci proteinů kořenové části vojtěšky seté. Bylo zjištěno, že množství proteinu v kořenech je významně ovlivněno stresem ze soli. Gutsch et al. (2018) popsala změny proteomu vojtěšky seté vlivem kadmia, obsaženého v půdě.

Výsledné koncentrace proteinů v naší studii tak odpovídají tomu, že rostliny vojtěšky mohly být vystaveny kombinaci vícero stresorů a stanovení proteinů proběhlo po delší době expozice anthelmintikem. Taktéž byla analyzována nadzemní část rostlin (subcelulární frakce z listů), nikoliv kořenová část.

Vliv ABZ na enzymatický antioxidační systém byl studován měřením aktivit vybraných antioxidačních enzymů (APX, CAT, GPX, GR, GST, POX a SOD). Specifická aktivita APX byla signifikantně snižena u vzorků 35g ABZ 2019.

U vzorků ovlivněných 105 g trusu s ABZ byla specifická aktivita APX zvýšená. Pouze u rostlin sklizených v roce 2020 bylo zvýšení aktivity u ovlivněných vzorků ABZ vyhodnoceno jako statisticky významné.

Aktivita CAT byla měřena 2 metodami, u obou metod byly naměřeny podobné hodnoty specifické aktivity CAT. U vzorků ovlivněných ABZ byla detekována zvýšená aktivita CAT metodou s peroxidem vodíku a molybdenanem amonným i metodou s peroxidem vodíku. Signifikantně zvýšená aktivita byla zaznamenána u vzorků 35g ABZ 2019 oběma metodami, u vzorků 105g ABZ bylo statisticky významné zvýšení vyhodnoceno pouze metodou s peroxidem vodíku.

Aktivita enzymů GPX a GR nebyla v rostlinách vojtěšky detekována ani u skupiny rostlin 2019, ani 2020. Specifická aktivita GST se u vzorků ovlivněných ABZ zvýšila, jediné statisticky významné zvýšení bylo detekováno u vzorků 105g ABZ 2020.

Specifická aktivita POX byla detekována 2 metodami. Substrát guajakol se ukázal jako nevhodný pro stanovení POX u vojtěšky, neboť aktivita byla detekována pouze ve vzorcích sklizených v roce 2020. U rostlin 2019 nebyla metodou s guajakolem naměřena žádná aktivita. Metodou s pyrokatecholem byla u vzorků ovlivněných ABZ naměřena signifikantně zvýšená specifická aktivita POX a to jak u vzorků 35g ABZ 2019 tak u vzorků 105g ABZ 2019 i 2020.

Ze všech studovaných enzymů byla detekována snížená aktivita pouze u enzymu SOD. U vzorků 105g ABZ sklizených 2019 i 2020 byla zaznamenána statisticky významně snížená aktivita SOD. U vzorků 35g ABZ došlo taktéž k poklesu aktivity, ale snížení nebylo vyhodnoceno jako signifikantní.

Antioxidačním enzymům vojtěšky seté se věnoval Martí et al. (2009), který sledoval změny v aktivitách antioxidačních enzymů vlivem ropného kalu přítomného v půdě. Bylo zjištěno zvýšení aktivity enzymů APX, GST, POX a SOD. Helaoui et al. (2020), popsal zvýšení aktivity enzymů POX a GST po vystavení rostlin vojtěšky seté niklu obsaženému v půdě.

Dusičnan olovnatý způsobil u vojtěšky seté zvýšení aktivity GR, APX a SOD a také byla detekována významně zvýšená exprese genů APX a SOD (*Hattab et al., 2016*).

Jak už bylo zmíněno výše, není mnoho studií, které by se věnovaly vlivu albendazolu na antioxidační systém rostlin. Proto není mnoho dat, které bychom mohli použít k porovnání našich výsledných aktivit antioxidačních enzymů a jejich ovlivnění ABZ u vojtěšky.

Graňáková (2019) se ve své diplomové práci zabývala vlivem fenbendazolu, zástupce benzimidazolových anthelmintik, na antioxidační systém sóji (*Glycine max*).

U enzymů APX, GST, POX a SOD byla detekována zvýšená aktivita u vzorků ovlivněných anthelmintikem. Pro stanovení GR a GPX využila stejné metody jako v naší studii, a v subcelulárních frakcích listů sóji také nebyla naměřena specifická aktivita těchto enzymů. Stuchlíková et al. (2018) popsala změny v aktivitě antioxidačních enzymů jitrocele kopinatého po ovlivnění flubendazolem a fenbendazolem. Ze studovaných enzymů byla významně snížena aktivita SOD.

Oproti předchozím studiím byly u vojtěšky seté v této studii detekovány nízké hodnoty specifických aktivit, konkrétně u APX, GST a POX byly detekovány aktivity pod 1 U/mg. Rozdíly by mohly být způsobené druhovou odlišností v metabolismu anthelmintik i v aktivitě antioxidačních enzymů.

Meziročně byly porovnány aktivity antioxidačních enzymů u kontrolních skupin vojtěšky neovlivněných ABZ. Byly zjištěny signifikantní rozdíly u enzymů CAT metodou s molybdenanem, GST a POX. Z dostupných dat z ČCHMÚ byly v roce 2019 a 2020 (březen-květen) porovnány teplota, srážky a doba slunečního svitu. Teplota se meziročně výrazně nelišila. Oproti roku 2019 bylo však v roce 2020 méně srážek a byl zaznamenán výraznější sluneční svit. Tyto klimatické rozdíly nebyly nijak výrazné, ale mohly být faktorem, který způsobil meziroční rozdíly v specifických aktivitách výše uvedených antioxidačních enzymů kontrolních rostlin.

U rostlin sklizených v roce 2020 byly v listech měřeny koncentrace fotosyntetických pigmentů, chlorofylů a karotenoidů. U rostlin vojtěšky ovlivněných ABZ byla zvýšena koncentrace chlorofylu A, nárůst koncentrace nebyl vyhodnocen jako signifikantní.

Pouze u karotenoidů byl sledován statisticky významný rozdíl u vzorků ovlivněných ABZ oproti kontrolním vzorkům, byla detekována signifikantně nižší koncentrace u vzorků 105g ABZ 2020.



Z naměřených koncentrací byl vypočten poměr chlorofyl A/chlorofyl B a poměr chlorofylů A+B/karotenoidů. Hodnoty obou sledovaných poměrů byly zvýšeny u vzorků ovlivněných albendazolem.

Stanovení fotosyntetických pigmentů je vhodný marker pro sledování rostlin pěstovaných v reálných podmínkách, protože na různé abiotické stresory reaguje rostlina zvýšením nebo snížením koncentrace světlosběrných pigmentů. Slouží také jako ukazatel klimatických a půdních podmínek rostlin.

Lichtenthaler (2001) uvedl vliv slunečního záření na koncentraci chlorofylů a karotenoidů. U stinných listů dochází ke snížení poměrů chlorofyl A/chlorofyl B jako důsledku nedostatku slunečního záření. Poměr chlorofylu A+B/karotenoidů se také snižuje v případě nažloutlých a starých listů jako důsledek stárnutí. Snížení poměru chlorofyl A/chlorofyl B bylo detekováno u fazolí tonka pěstovaných ve stínu (*Gonçalves et al., 2001*). Lorenzo et al. (2019) se zabýval vlivem stínu na rostliny vojtěšky seté, výsledky jeho práce ukázaly na snížení koncentrace chlorofylů, především chlorofylu B. Koncentrace karotenoidů se oproti chlorofylům zvýšila. Vzhledem k tomu, že rostliny vojtěšky pro naši studii byly pěstovány na slunném místě, nebylo očekáváno snížení poměru chlorofylů z důvodu růstu rostlin ve stínu.

Na pšenici a hrachu byly popsány účinky UV-B záření a sucha (*Alexieva et al. 2001*). Zvýšené UV záření způsobilo snížení obsahu chlorofylu u obou druhů. Sucho způsobilo zvýšení chlorofylů u hrachu, u pšenice se účinky sucha neprojevíly změnou koncentrace chlorofylu. Při kombinaci obou stresorů tedy UV-B záření a sucha nebyl detekován rozdíl koncentrace chlorofylů oproti kontrolní skupině vzorků u obou studovaných modelových rostlin. U rostlin vojtěšky seté vystavené suchu došlo ke snížení koncentrace chlorofylů, více byla snížena koncentrace chlorofylu B, což se projevilo zvýšením hodnoty poměru chlorofyl A/chlorofyl B (*Wang et al., 2020*).

Složení půdy, jako je množství soli, obsah minerálů, těžké kovy a toxické látky výrazně ovlivňují syntézu fotosyntetických pigmentů.

Rtuť v půdě způsobila v raných stádiích růstu pšenice zvýšení koncentrace chlorofylů (chlA, chlB), delší dobou expozice v pozdějších stádiích růstu byl zaznamenán pokles koncentrace chlorofylů (*Liu et al., 2010*).

Vysoké koncentrace chemikálií využívaných k barvení v textilním průmyslu způsobily snížení koncentrace chlorofylů ve vojtěšce seté (*Mahawar a Akhtar 2016*).

Nesterodní antiflogistika (diklofenak, ibuprofen, naproxen) způsobily u rostlin lebedy rozkladité (*Atriplex patula*), lociky salátové (*Lactuca sativa*) a špenátu setého (*Spinacia oleracea*) snížení koncentrace chlorofylů a výrazné snížení karotenoidů (*Opris et al., 2020*). K poklesu karotenoidů dochází v podmínkách silného stresoru a snížení koncentrace karotenoidů je spojeno se sníženou kapacitou pro bezpečné rozptýlení excitační energie (*Munné-Bosch a Alegre 2000*). Zasolení půdy způsobilo snížení chlorofylů a karotenoidů u rýže (*Chandramohanan et al., 2014*), vojtěšky (*Xiong et al., 2018*) a bobu obecného (*Quados 2010*).

Při porovnání výsledků předešlých studií se ukazuje, že zvýšení obou sledovaných poměrů světlosběrných pigmentů v této práci nastalo jako důsledek působení několika stresorů na rostliny vojtěšky seté. Vzhledem k nízkým srážkám v roce 2020 (březen-květen) mohlo být dalším stresorem sucho a podílet se tak na ovlivnění antioxidačního systému rostlin.

Z výsledků této studie vyplývá, že albendazol v životním prostředí ovlivnil antioxidační systém vojtěšky seté. Byly zjištěny změny ve specifických aktivitách antioxidačních enzymů a také byly detekovány změny v neenzymatických antioxidantech, karotenoidech a jednotlivých poměrech chlorofylů a karotenoidů. Detekované změny jsou výsledkem působení ABZ, klimatických a půdních podmínek. Což odpovídá předchozím studiím, kde výsledky ukázaly, že na rostliny v polních podmínkách působí několik stresorů současně. Změny v antioxidačním systému mohou vyvolávat poškození rostlinných buněk oxidačním stresem, protože tyto změny vyvolávají nerovnováhu mezi tvorbou a odstraňováním reaktivních forem kyslíku. Hromadění ROS v rostlině tak působí negativně na růst a fyziologický vývoj rostliny. V konečném důsledku může dojít ke sníženému růstu nebo až k úhynu rostlin.

Potvrzuje se tak doporučení vycházející z předchozích studií o enviromentálním riziku anthelmintik, tedy nehnojit trusem zvířat léčených anthelmintiky a taktéž nechovat léčená zvířata na pastvinách, kde hrozí riziko kontaminace půdy a vody (*Bártíková et al., 2016; Prchal et al., 2016; Vokřál et al., 2019*).

Pro získání komplexnějších výsledků by bylo vhodné doplnit přesné informace o klimatických podmínkách přímo z místa růstu rostlin. Vzhledem k náchylnosti vojtěšky na půdní podmínky by pro další studie byl také vhodný rozbor půdy včetně informací o přítomnosti možných kontaminantů (těžké kovy a zvýšený obsah solí).

## 7. ZÁVĚR

V této práci byl sledován vliv benzimidazolového anthelmintika albendazolu na aktivitu antioxidantního systému vojtěšky seté (*Medicago sativa*), často vysazované pro zemědělské účely. Rostliny byly pěstovány v reálných podmínkách, na poli. Studie probíhala ve dvou skupinách rostlin, které byly ovlivněny i sklizeny ve stejných měsících (únor-květen), v roce 2019 a následně 2020.

- Pro přípravu subcelulárních frakcí vojtěšky seté využita nať rostlin.
- Byla stanovena koncentrace bílkovin metodou dle Bradfordové ve vzorcích kontrolních a vzorcích ovlivněných albendazolem. U vzorků ovlivněných byla detekována nižší koncentrace bílkovin. Výsledná koncentrace byla použita pro stanovení specifické aktivity vybraných antioxidantních enzymů.
- Specifická aktivita vybraných antioxidantních enzymů (APX, CAT, GST, GPX, GR, POX, SOD) byla stanovena ve vzorcích kontrolních a vzorcích ovlivněných albendazolem. Specifická aktivita nebyla naměřena u enzymů GR a GPX u obou skupin vzorků, 2019 i 2020. Nízká aktivita byla detekována u POX metodou s guajakolem, ale pouze u skupiny rostlin 2020. U enzymů CAT, GST, POX došlo ke zvýšení aktivity u vzorků ovlivněných albendazolem. U enzymu SOD byla u ovlivněných vzorků albendazolem detekována snížená aktivita oproti kontrolním vzorkům.
- Ve vzorcích 2020 byly stanoveny stresové markery: karotenoidy, chlorofyl A a chlorofyl B. Pouze u karotenoidů došlo k signifikantní změně koncentrace. Ze stanovených koncentrací fotosyntetických pigmentů byly stanoveny poměry: chlA/chlB a poměr chlA+chlB/karotenoidy. U obou poměrů byla hodnota vyšší u vzorků ovlivněných ABZ.

Albendazol přítomný v trusu ovce domácí ovlivnil aktivitu antioxidantního systému vojtěšky seté (*Medicago sativa*) u obou skupin vzorků 2019 i 2020.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

35g ABZ	vzorky ovlivněny 35 g trusu s obsahem albendazolu 14 µg
105g ABZ	vzorky ovlivněny 105 g trusu s obsahem albendazolu 42 µg
ABC	ATP binding cassette
ABZ	albendazol
ABZSO	albendazol sulfoxid
ADH	alkoholdehydrogenáza
AKR	aldo-ketoreduktázy
ALDH	aldehyddehydrogenáza
APX	askorbátperoxidáza
AsA	kyselina askorbová
APX	askorbátperoxidáza
CAT	kataláza
FEN	fenbendazol
FLU	flubendazol
GST	glutathion-S-transferáza
GPX	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
IVM	ivermektin
KON	vzorky kontrolní, ovlivněny 35 g trusu bez obsahu albendazolu
MATE	multidrug and toxin extrusion protein
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
POX	peroxidáza
ROS	reaktivní formy kyslíku
XME	enzymy metabolizující xenobiotika
SMS	půdní vícedruhový systém
SOD	superoxiddismutáza
SULT	sulfotransferáza
UGT	UDP-glykosyltransferáza

## 9. SEZNAM LITERATURY

AGARUSSI, Mariele Cristina Nascimento, Rosinea APARECIDA DE PAULA a Vanessa PAULA DA SILVA. Novel lactic acid bacteria strains as inoculants on alfalfa silage fermentation. *Scientific Reports*. 2019, (9).

AHMAD, Parvaiz, Cheruth Abdul JALEEL a Mohamed A. SALEM. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, **30**(3), 161–175.

AHMAD, P., R. JOHN a M. SARWAT. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*. 2008, **2**(4), 353-366.

ALEXIEVA, V., I. SERGIEV a S. MAPELLI. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment*. 2001, **24**(12), 1337-1344.

ALVAREZ, L.I., S.F. SÁNCHEZ a F.A. IMPERIALE. Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2000, **94**(1-2), 75-89.

ALVAREZ, L. I., S. F. SAÂNCHEZ a C. E. LANUSSE. In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1999, **22**, 77-86.

AMTMANN, Anna, Stephanie TROUFFLARD a Patrick ARMENGAUD. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum*. 2008, **133**(4), 682-691.

ARORA, Ajay, R. K. SAIRAM a G. C. SRIVASTAVA. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 2002, **82**(10), 1227-1238.

ASADA, Kozi. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*. 2006, **141**, 391–396.

ATKINSON, Nicky J. a Peter E. URWIN. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*. 2012, **63**(10), 3523-3243.

ANTOCI, Vasilichia, Dumitrelea CUCU, Gheorghita ZBANCIOC a Costel MOLDOVEANU. Bis-(imidazole/benzimidazole)-pyridine derivatives: synthesis, structure and antimycobacterial activity. *Future medicinal chemistry*. 2020, **12**(3), 207–222. ISSN 1756-8919.

- BAGUERA, Angel J., John JENSEN a Paul Henning KROGH. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*. 2000, **40**, 751-757
- BALE, Jeffery S., Gregory J. MASTERS, Ian D. HODKINSON a Caroline AWMACK. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*. 2002, **8**(1), 1-16.
- BÁRTÍKOVÁ, Hana, Lenka SKÁLOVÁ a Lucie STUHLÍKOVÁ. Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug Metabolism Reviews*. 2015, **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.
- BEN, Weiwei, Xun PANB a Zhimin QIANG. Occurrence and partition of antibiotics in the liquid and solid phases of swine wastewater from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Environmental Science Processes & Impacts*. 2013, **15**, 870-875.
- BEYNON, S.A. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Veterinary Parasitology*. 2012, **189**(1), 113-124
- BIENERT, Gerd P., Anders L.B. MØLLER a Kim A. KRISTIANSEN. Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(2), 1183-1192.
- BODEČEK, Štěpán, Zuzana KECEROVÁ a Anna. *Endoparazité u koní: diagnostika, terapie, prevence - výukový materiál*. Brno: Veterinární a farmaceutická fakulta, 2017.
- BOHÁČ, Jozef. *Šľachtěníe rastlín*. 1. Bratislava: Príroda, 1990. ISBN 80-07-00231-6.
- BONILLA, Mariana, Ana DENICOLA, Sergey V. NOVOSELOV, Anton A. TURANOV, Anna PROTASIO, Darwin IZMENDI, Vadim N. GLADYSHEV a Gustavo SALINAS. Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J Biol Chem*. 2008, **26**(283), 17898-17907.
- BORA, Kundan Singh a Anupam SHARMA. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*. 2011, **49**(2), 211-220.
- BORA, Kundan Singh a Anupam SHARMA. Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011.
- BOXALL, Alistair B.A. The environmental side effects of medication. *EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION*. 2004, **5**(12), 1110-1116.

- BROCKER, Chad, Melpomene VASILIOU a Sarah CARPENTER. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*. 2013, **237**(1), 189–210.
- CARLBERG, Inger a Bengt MANNERVIK. Glutathione reductase. *Methods in enzymology*. 1985, (113), 484-490.
- CAUNII, Angela, George PRIBAC, Ioana GROZEA a Dorin GAITIN. Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chemistry Central Journal*. 2012, **6**(123).
- CROOM, Edward. Chapter Three-Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012, (112), 31-88.
- DAS, Kaushik a Aryadeep ROYCHOUHURY. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2014, **2**(53), 1-13
- DAT, J., S. VANDENABEELE a E. VRANOVÁ. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000, **57**, 779–795.
- DAYAN, A.D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*. 2003, **86**(2-3), 141-159.
- DEMIDCHIK, Vadim. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 2015, **109**, 212-228.
- DELORENZO, M E, G I SCOTT a P E ROSS. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001, **20**(1), 84-98.
- DEYL, Miloš a Květoslav HÍSEK. *Naše květiny*. 3. Praha: Academia, 2001.
- DIXON, David P., Mark SKIPSEY a Robert EDWARDS. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 2010, **71**(4), 338-350.
- DIXON, David P., Timothy HAWKINS a Patrick J. HUSSEY. Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany*. 2009, **60**(4), 1207–1218.
- DOMKE, Atle VM, Christophe CHARTIER a Bjørn GJERDE. Worm control practice against gastro-intestinal parasites in Norwegian sheep and goat flocks. *Acta veterinaria scandinavia*. 2011, **29**(53), 1-9.
- DROTAR, Annamarie, Patricia PHELPS a Ray FALLAB. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*. 1985, **1**(42), 35-40.



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

ENEJOH Os, a MM SULEIMAN. Anthelmintics and their application in veterinary medicine. *Research in Medical & Engineering Sciences*. 2017, **2**(3). ISSN:2576-8816

FERNANDEZ, Adria, Craig SHEAFFER a Nicole TAUTGES. *Alfalfa, Wildlife & the Environment*. 2. St. Paul, Minnesota: National Alfalfa and Forage Alliance, 2019.

FLOHÉ, Leopold a Wolfgang A. GÜNZLER. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 1984, **105**, 114-121.

FUJITA, Miki, Yasunari FUJITA a Yoshiteru NOUTOSH. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*. 2006, **9**(4), 436-442.

FUKAI, Tohru a Masuko USHIO-FUKAI. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidant Redox Signaling*. 2011, **15**(6).

GARRIC, Jeanne, Bernard VOLLAT a Karen DUIS. Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*. 2007, **69**(6), 903-910.

GILL, Sarvajeet Singh a Narendra TUTEJA. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, **48**(12), 909-930.

GOESSENS, T., S. D. BAERE a N. D. TROYER. Highly sensitive multi-residue analysis of veterinary drugs including coccidiostats and anthelmintics in pond water using UHPLC-MS/MS: application to freshwater ponds in Flanders, Belgium. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 2020, **22**, 2117-2131.

GONÇALVES, J., R. MARENCO a G. VIEIRA. CONCENTRATION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS AND CHLOROPHYLL FLUORESCENCE OF MAHOGANY AND TONKA BEAN UNDER TWO LIGHT ENVIRONMENTS. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 2001, **13**(2).

GÓTH, Lászlo. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinics Chimica Acta*. 1991, **2-3**(196), 143-152. Dostupné z: doi:10.1016/0009-8981(91)90067-M

GRAMAN, Josef. *Šlechtění zemědělských plodin: Šlechtění píce*. 1. Praha: Editpress, 1991. ISBN 80-213-0089-2.

GRAŇÁKOVÁ, Patrícia. *Diplomová práce: Modulácia expresie a aktivity vybraných detoxikačných enzýmov rastlín anthelmintikami*. 2019.

GULLNER, Gábor, Tamas KOMIVES a Lóránt KIRÁLY. Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*. 2018, **9**

GUTSCH, Annelie, Salha ZOUAGHI a Jenny RENAUT. Changes in the Proteome of *Medicago sativa* Leaves in Response to Long-Term Cadmium Exposure Using a Cell-Wall Targeted Approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**.

GYURIK, ROBERT J., ALFRED W. CHOW a BEVERLY ZABER. Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug metabolism and disposition*. 1981, **9**(6).

HALLIWELL, Barry. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*. 2006, **141**, 312–322.

HANDY, Diane E., Edith LUBOS, Yi YANG, John D. GALBRAITH, Neil KELLY, Ying-Yi ZHANG, Jane A. LEOPOLD a Joseph LOSCALZO. Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J Biol Chem*. 2009, **18**(284), 11913–11921.

HAN, Chao, Qing LIU a Yan YANG. Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regulation*. 2009, **58**, 153-162.

HATTAB, Sara, Sabrine HATTAB a Maria Laura FLORES-CASSERES. Characterisation of lead-induced stress molecular biomarkers in *Medicago sativa* plants. *Environmental and Experimental Botany*. 2016, (123), 1-12.

HATZ, Sonja, John D. C. LAMBERT a Peter R. OGILBY. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2007, **6**(10), 1106-1116.

HELAOUI, Sondes, Iteb BOUGHATTASA a Sabrine HATTA. Physiological, biochemical and transcriptomic responses of *Medicago sativa* to nickel exposure. *Chemosphere*. 2020, (249).

HILLIS, Derek G, James FLETCHER a Keith R SOLOMON. Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011, **60**(2), 220-232

HIRSCHMANN, Felix, Florian KRAUSE a Jutta PAPENBROCK. The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Frontiers in Plant Science*. 2014, **5**.

HIRSCHMANN, Felix, Florian KRAUSE a Petra BARUCH. Structural and biochemical studies of sulphotransferase 18 from *Arabidopsis thaliana* explain its substrate specificity and reaction mechanism. *Scientific Reports*. 2017, **7**.

CHROMÁ, LUDMILA, MARTINA MACKOVÁ a TOMÁŠ MACEK. Rostlinné cytochromy P450 a peroxidázy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chemické listy*. 2001, **95**, 212-222

CHOUDHURY, Shuvasish, Piyalee PANDA a Lingaraj SAHOO. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*. 2013, **8**(4).

IGLESIAS, Alejandra, Carolina NEBOT a Jose M MIRANDA. Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*. 2012, **19**(8), 3235-3249.

JENSEN, John a Janeck J. SCOTT-FORDSMAND. Ecotoxicity of the veterinary pharmaceutical ivermectin tested in a soil multi-species (SMS) system. *Environmental Pollution*. 2012, (171), 133-139

JONES, Clive G., J. Daniel HARE a Steve J. COMPTON. Measuring plant protein with the Bradford assay. *Journal of Chemical Ecology*. 1989, **15**, 979–992.

JOUILI, Hager, Houda BOUAZIZI a Ezzeddine EL FERJANI. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011, **33**(6).

JØRGENSEN, S.E. a Bent HALLING-SØRENSEN. Drugs in the environment. *Chemosphere*. 2000, **40**(7), 691-699

KLEIN, Marion a Jutta PAPENBROCK. The multi-protein family of Arabidopsis sulphotransferases and their relatives in other plant species. *Journal of Experimental Botany*. 2004, **55**(404), 1809–1820.

KLEIN, Markus, Bo BURLA a Enrico MARTINOIA. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Letters*. 2006, **580**(4), 1112-1122.

KLÍR, Jan, Jan HABERLE a Pavel RŮŽEK. *Postupy hospodaření pro efektivní využití dusíku a snížení jeho ztrát: Certifikovaná metodika pro praxi*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i, 2018. ISBN 978-80-7427-273-8.

KOMIVES, Tamas a Gábor GULLNER. Phase I xenobiotic metabolic systems in plants. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*. 2005, **60**(3-4), 179-185.

KONGA, W.D., Y.G. ZHUA a Y.C. LIANG. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*. 2007, **1**(147), 187-193.

KOTYZA, Jan, Petr SOUDEK a Zdeněk KAFKA. LÉČIVA – „NOVÝ“ ENVIROMENTÁLNÍ POLUTANT. *Chemické listy*. 2009, (103), 540-547.

KOZI, Asada. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 1992, **58**(2), 235-241.

- KRIEGER-LISZKAY, Anja, Christian FUFUZAN a Achim TREBST. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*. 2008, **98**, 551–564.
- KROGH, Kristine A., Gitte G. JENSEN a Manuel K. SCHNEIDER. Analysis of the dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils. *Chemosphere*. 2009, **75**(8), 1097-1104.
- KULLIK, Sigrun A a Andrew M BELKNAP. Flexing the PECs: Predicting environmental concentrations of veterinary drugs in Canadian agricultural soils. *Integrated Environmental Assessment Management*. 2017, **13**(2), 331-341.
- KUMAR, Smita a Prabodh K. TRIVEDI. Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. *Frontiers in Plant Science*. 2018, **9**.
- KUMIRSKA, Jolanta, Marta WAGIL a Stefan STOLTE. Anthelmintics in the Aquatic Environment: A New Analytical Approach. *Current Analytical Chemistry*. 2016, **12**(3), 227 - 236.
- KURWADKAR, Sudarshan, Garrett STRUCKHOFF a Kameron PUGH. Uptake and translocation of sulfamethazine by alfalfa grown under hydroponic conditions. *Journal of Environmental Sciences*. 2017, **53**, 217-223.
- LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*. 1990, **6**(4), 112-115.
- LAMKA, Jiří a Lubomír DUCHÁČEK. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 9788024628226
- LANUSSE, Carlos E. a Roger K. PRICHARD. *Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics*. 1993, **49**(2-4), 123-158.
- LANUSSE, C. E., R. K PRICHARD a B. NARES. Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle. *XENOBIOTICA*. 1991, **22**(4), 419-426.
- LEI, Yaogeng, Abdelali HANNOUFA a Peiqiang YU. The Use of Gene Modification and Advanced Molecular Structure Analyses towards Improving Alfalfa Forage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, (18).
- LEFÈVRE, François a Marc BOUTRY. Towards Identification of the Substrates of ATP-Binding Cassette Transporters. *Plant Physiology*<sup>®</sup>. 2018, **178**, 18-39.
- LI, Rongrong, Di JIANG a Mingli ZHENG. Microbial community dynamics during alfalfa silage with or without clostridial fermentation. *Scientific Reports*. 2020, (10).

- LICHTENTHALER, Hartmut K. The Stress Concept in Plants: An Introduction. *MARROW: Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998, **851**(1), 187-198.
- LIU, Tao, J. VAN STADEN a W.A. CRESS. Salinity induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of soybean (*Glycine max* (L.)) roots. *Plant Growth Regulation*. 2000, **30**, 49-54.
- LIEBIG, Markus, Álvaro Alonso FERNANDEZ a Elke BLÜBAUM-GRONAU. Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Special Issue: Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals (ERAPharm)*. 2010, **6**(S1), 567-587.
- LICHTENTHALER, Hartmut K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrans. *Methods in Enzymology*. 1987, **34**(148), 350-382.
- LICHTENTHALER, Hartmut K. a Claus BUSCHMANN. Extraction of photosynthetic tissue: Chlorophylls and carotenoids. *Current protocols in food analytical chemistry*. 2001, F4.2.1-F4.2.6.
- LONG, Ruicai, Mingna LI a Tiejun ZHANG. Comparative Proteomic Analysis Reveals Differential Root Proteins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* in Response to Salt Stress. *Frontiers in Plant Science*. 2016.
- LORENZO, Christian D., Mariana S ANTONIETTI a Pedro GARSIA-GAGLIARDI. Improvement of alfalfa forage quality and management through the down-regulation of MsFTa1. *Plant Biotechnology Journal*. 2020, **18**, 944–954.
- LORENZO, Christian D., Javier Alonso ISERTE a Maximiliano Sanchez LAMAS. Shade delays flowering in *Medicago sativa*. *The Plant Journal*. 2019, (99), 7-22.
- MADGWICK, James W., Jon S. WEST a Rodger P. WHITE. Impacts of climate change on wheat anthesis and fusarium ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology*. 2011, **130**, 117-131
- MAHAWAR, Pratibha a Azra AKHTAR. Impact of dye effluent on growth and chlorophyll content of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *ANNALS OF PLANT SCIENCES*. 2016, **5**(10), 1432-1435.
- MAVROVA, Anelia Ts., Kamelya ANICHINA a Dimitar I. VUCHEV. Antihelminthic activity of some newly synthesized 5(6)-(un)substituted-1H-benzimidazol-2-ylthioacetyl piperazine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2006, **41**, 1401-1420.
- MARTÍ, M. Carmen, Daymi CAMEJO a Nieves FERNÁNDEZ-GARCÍA. Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, (171), 879–885.

- MERIGA, Balaji, Krishna REDDY a Rajender RAO. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*. 2004, **161**(1), 63-68.
- MITTLER, Ron. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. 2006, **11**(1), 15-19.
- MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trend in plant science*. 2002, **7**(9), 405-410.
- MITTLER, Ron. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*. 2017, **22**(1), 11-19.
- MHAMDI, Amna, Guillaume QUEVAL a Sejr CHAOUCH. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 2010, **61**(15), 4197–4220.
- MOONEY, D., C. COXON a K.G. RICHARD. A new sensitive method for the simultaneous chromatographic separation and tandem mass spectrometry detection of anticoccidials, including highly polar compounds, in environmental waters. *Journal of chromatography A*. 2020, (1618).
- MOONEY, D., C. COXON a K.G. RICHARD. A new sensitive method for the simultaneous chromatographic separation and tandem mass spectrometry detection of anticoccidials, including highly polar compounds, in environmental waters. *Journal of chromatography A*. 2020, (1618).
- MOLAEI, A Rad, H. GHOURCHIAN, A.A. MOOSAVI-MOVAHEDI, J. HONG a K. NAZARIB. Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*. 2007, (362), 38-43.
- MORANT, Marc, Søren BAK a Birger Lindberg MØLLER. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology Volume*. 2003, **14**(2), 151-162.
- MØLLER, I.M. a B.K. KRISTENSEN. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2004, **3**(8), 730-735.
- MUNNÉ-BOSCH, S. a L. ALEGRE. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*. 2000, (210), 925–931.
- NAKANO, Yoshiyuki a Kozi ASADA. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*. 1987, **1**(28), 131-140.

NAVRÁTILOVÁ, Martina, Lucie RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ a Kateřina MOŤKOVÁ. The Uptake of Ivermectin and Its Effects in Roots, Leaves and Seeds of Soybean (*Glycine max*). *Molecules*. 2020, **25**(16).

NELSON, David a Danièle WERCK-REICHHART. A P450-centric view of plant evolution. *The Plant Journal*. 2011, **66**, 194–211.

NISHIMURA, Yosuke, Toshiaki TOKIMATSU a Masaaki KOTERA. Genome-wide analysis of plant UGT family based on sequence and substrate information. *Genome Inform.* 2010, **24**, 127-138.

NOCTOR, Graham, Sonja VELJOVIC-JOVANOVIC a Simon DRISCOLL. Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: a Predominant Role for Photorespiration? *Annals of Botany*. 2002, **89**(7), 841–850.

NOVÁKOVÁ, Anežka. *Diplomová práce: Účinky a metabolismus anthelmintik v pícninách*. 2020.

OPRIŠA, Ocsana, Ildikó LUNGA a Maria-Loredana SORAN. Investigating the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the composition and ultrastructure of green leafy vegetables with important nutritional values. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020, (151), 342–351.

PANDIAN, Balaji Aravindhan, Rajendran SATHISHRAJ a Maduraimuthu DJANAGUIRAMAN. Role of Cytochrome P450 Enzymes in Plant Stress Response. *Antioxidants*. 2020, **9**.

PANDEY, Veda P, Manika AWASTHI a Swati SINGH. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 2017, **6**(1).

PFLUGMACHER, Stephan, Sandra KÜHN a Sang-Hyup LEE. Green Liver Systems® for Water Purification: Using the Phytoremediation Potential of Aquatic Macrophytes for the Removal of Different Cyanobacterial Toxins from Water. *American Journal of Plant Sciences*. 2015, (6), 1607-1618.

PINTO, Ernani, Teresa C. S. SIGAUD-KUTNER a Maria A. S. LEITÃO. HEAVY METAL – INDUCED OXIDATIVE STRESS IN ALGAE. *Journal of Phycology*. 2003, **39**(6), Pages 1008-1018  
PINTÓ-MARIJUAN, Marta a Sergi MUNNÉ-BOSCH. Photo-oxidative stress markers as a measure of abiotic stress-induced leaf senescence: advantages and limitations. *Journal of Experimental Botany*. 2014, **65**(14), 3845–3857.

PITERKOVÁ, Jana, Kateřina TOMÁNKOVÁ a Lenka LUHOVÁ. OXIDATIVNÍ STRES: LOKALIZACE TVORBY AKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A JEJICH DEGRADACE V ROSTLINNÉM ORGANISMU. *Chemické listy*. 2005, **99**, 455-466.

- PODLIPNÁ, Radka, Lenka SKÁLOVÁ a Helena SEIDLOVÁ. Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology*. 2013, **144**, 216-224
- POPOVA, Inna E., Daniel A. BAIR a Kenneth W. TATE. Sorption, leaching, and surface runoff of beef cattle veterinary pharmaceuticals under simulated irrigated pasture conditions. *Journal of Environmental Quality*. 2013, **42**(4), 1167–1175.
- PRCHAL, Lukáš, Radka PODLIPNÁ a Jiří LAMKA. Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, **23**, 13015–13022.
- QADOS, Amira M.S. Abdul. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2011, **10**, 7-15.
- QI, Junsheng, Jinlong WANG a Zhizhong GONG. Current Opinion in Plant Biology Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology Volume 38, August 2017, Pages 92-100*. 2017, **38**, 92-100.
- RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, Lucie, Petra MATOUŠKOVÁ a Ivan VOKŘÁL. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *IJP: Drugs and Drug Resistance*. 2018, (8), 50–58.
- RANA, M.G., R.V.KATBAMNA a A.A. PADHYA. In vitro antioxidant and free radical scavenging studies of alcoholic extract *Medicago sativa* L. *Romanian Journal of Biology - Plant Biology*. 2010, **55**(1), 15-22.
- REA, Philip A. Plant ATP-Binding Cassette Transporters. *Annual Review of Plant Biology*. 2007, **58**, 347-375.
- REINEMER, Peter, Lars PRADE a Peter HOF. Three-dimensional Structure of Glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: Structural Characterization of Herbicide-conjugating Plant Glutathione S-transferases and a Novel Active Site Architecture. *Journal of Molecular Biology*. 1996, (255), 289-309.
- RIVIERE, J Edmond a Mark G PAPICH. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 9780813820613 0813820618.
- ROCK, Amanda. *Veterinary Pharmacology: A Practical Guide for the Veterinary Nurse*. 1. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2007. ISBN 9780702032721.
- ROSS, Joe, Yi LI a Eng-Kiat LIM. Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology*. 2001, **2**(2).



SANGWAN, Veena, Björn Lárus ÖRVAR a John BEYERLY. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal*. 2002, **31**(5), 629-638.

SEDDIGHFAR, Masoud, Sayid Mahdi MIRGHAZANFARI a Masoumeh DADPAYC. Analgesic and anti-inflammatory properties of hydroalcoholic extracts of *Malva sylvestris*, *Carum carvi* or *Medicago sativa*, and their combination in a rat model. *Journal of Integrative Medicine*. 2020, **18**(2), 181-188.

SHARMA, Pallavi a Rama Shanker DUBEY. Drought Induces Oxidative Stress and Enhances the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings. *Plant Growth Regulation*. 2009, **46**, 209-221.

SHARMA, Pallavi, Ambuj Bhushan JHA a Rama Shanker DUBEY. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 2012.

SHIGETO, Jun a Yuji TSUTSUMI. Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New phytologist*. 2016, **209**(4), 1395-1402.

SKÁLOVÁ, Lenka, Iva BOUŠOVÁ a Barbora SZOTÁKOVÁ. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-1917-0

SOLANA, H.D., J.A. RODRIGUEZ a C.E. LANUSSE. Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasite. *Parasitol Res*. 2001, **87**, 275-280.

ŠPULÁK, Ondřej, Jan VÍTÁMVÁS a Dušan KACÁLEK. CHLOROPHYLL FLUORESCENCE, CHEMISTRY AND CONTENTS OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVE PIGMENTS IN SPOT-LIMED BEECH LEAVES. *CHEMISMUS A OBSAH FOTOSYNTETICKY*. 2011, **56**(4), 301-309.

STROMMER, Judith. The plant ADH gene family. *The Plant Journal*. 2011, **66**(1), 128–142.

STUHLÍKOVÁ, Lucie, Lenka SKÁLOVÁ a Barbora SZOTÁKOVÁ. Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, (147), 681-687.

STUHLÍKOVÁ, Lucie, Radka PODLIPNÁ a Barbora SZOTÁKOVÁ. 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, Martina NAVRÁTILOVÁ a Lenka LANGHANSOVÁ. The Identification of Metabolites and Effects of Albendazole in Alfalfa (*Medicago sativa*). *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**.

STUHLÍKOVÁ, Lucie, Robert JIRÁSKO a Lenka SKÁLOVÁ. Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*). *Chemosphere*. 2016, **157**, 10-17

SUZUKI, Nobuhiro, Rosa M. RIVERO a Vladimir SHULAEV. Abiotic and biotic stress combinations. *New phytologist*. 2014, **203**(1), 32-43.

SUZUKI, Nobuhiro a Ron MITTLE. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*. 2006, **126**(1), 45-51.

SYSLOVÁ, Eliška, Přemysl LANDA a Lucie RAISOVÁSTUHLÍKOVÁ. Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in *Arabidopsis thaliana* and its effect on transcriptome and proteome. *Chemosphere*. 2019, (218), 662-669.

SYSLOVÁ, Eliška, Přemysl LANDA, P a Martina NAVRÁTILOVÁ. Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*. 2019, (234), 528-535.

TANOU, Georgia, Athanassios MOLASSIOTIS a Grigorios DIAMANTIDIS. Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of Plant Physiology*. 2009, **166**(17), 1904-1913.

TERNES, Thomas, Matthias BONERZ a Nadine HERRMANN. Irrigation of Treated Wastewater in Braunschweig, Germany: An Option to Remove Pharmaceuticals and Musk Fragrances. *Chemosphere*. 2007, **66**(5), 894-904.

THOMSON, A. L., D. J. HUMPHRIES, L. A. CROMPTON a C. K. REYNOLDS. The effect of alfalfa (*Medicago sativa*) silage chop length and inclusion rate within a total mixed ration on the ability of lactating dairy cows to cope with a short-term feed withholding and refeeding challenge. *Journal of Dairy Science*. 2018, **101**(5), 4180–4192.

TUNA, A. Levent, Cengiz KAYA a Murat DIKILITAS. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*. 2008, **62**, 1–9.

UPADHYAY, Neha, Debojyoti KAR a Bhagyashri Deepak MAHAJAN. The multitasking abilities of MATE transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2019, **70**(18), 4643–4656.

VANACKER, H el ene, Tim L.W. CARVER a Christine H. FOYER. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*. 1998, **3**(117), 1103-1114.

- VÁRADY, M., E. PAPADOPOULOS, M. DOLINSKÁ a A. KÖNIGOVÁ. Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: sheep versus goats. *Helminthologia*. 2011, **48**(3), 137-144.
- VELICH, Jan. *Pícninářství*. 2. Praha: Editpress, 1991. ISBN 80-213-0106-6.
- VOKŘÁL, Ivan, Michaela ŠADIBOLOVÁ a Radka PODLIPNÁ. Ivermectin environmental impact: Excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety Volume*. 2019, (169), 944-949.
- WAGIL, Marta, Joanna MASZKOWSKA a Anna BIAŁK-BIELIŃSKA. A comprehensive approach to the determination of two benzimidazoles in environmental samples. *Chemosphere*. 2015, (119), 35-41.
- WAGIL, Marta, Anna BIAŁK-BIELIŃSKA a Alan PUCKOWSKI. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, **22**, 2566–2573.
- WAGNER, Daniela, Dominika PRZYBYLA a Roel op DEN CAMP. The Genetic Basis of Singlet Oxygen–Induced Stress Responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 2004, **306**(5699), 1183-1185.
- WERMA, S. a R.S. DUBEY. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003, 4(164), 645-655.
- XIONG, Xue, Nan LIU a Yu-qi WEI. 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.
- YAMAUCHI, Y., A. FURUTERA a K. SEKI. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiol Biochem*. 2008, **48**(8-9), 786-793.
- YE, Lingxiang a Yuesheng ZHANG. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 2001, **12**(22), 1987–1992
- ZHANG, Qing-Ling, De-De LIAN a Ming Ji ZHU. Antitumor Effect of Albendazole on Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (SCC) Cells. *BioMed Research International*. 2019.
- ZHU, Jian-Kang. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*. 2016, **167**(2), 313-324.
- ZHU, Jian-Kang. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2002, **53**, 247-273.