Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie

Šimon Sacher

Fytoextrakce nesteroidních protizánětlivých látek

Phytoextraction of non-steroidal anti-inflammatory substances

Bakalářská práce

Školitel: doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze dne 19. května 2024.

Šimon Sacher

Abstrakt

Fytoextrakce jednou z metod odstranění chemických polutantů z životního prostředí. V bakalářské práci byla sledována možnost fytoextrakce vybraných farmak a jednoho metabolitu farmaka pomocí kukuřice seté (*Zea mays*). Konkrétně byla zkoumána možnost fytoextrakce farmak ze skupiny NSAID. Jedním byl ibuprofen, jehož původní koncentrace v živném médiu 5 mg/l byla snížena za dobu 9 dní o 99 % a z původní koncentrace 10 mg/l téhož léčiva o 77 %. Zkoumána byla též možnost fytoextrakce metabolitu 2-hydroxyibuprofenu. Z jeho původní koncentrace 5 mg/l byla za dobu 9 dní koncentrace snížena o 47 %. Posledním zkoumaným xenobiotikem byl ketoprofen, jehož výchozí koncentrace 5 mg/l byla za 9 dní snížena o 89 %.

Byla stanovena koncentrace léčiv akumulovaných v rostlinném těle při stejném způsobu kultivace. Hodnoty koncentrací byly vyšší v listové části rostliny a pohybovaly se v rozmezí setin mg léčiva na g čerstvé hmotnosti rostliny. V kořenové části se pohybovaly v rozmezí tisícin mg na g čerstvé hmotnosti rostliny. Hodnoty odpovídající 2-hydroxyibuprofenu se nacházely pod limitem detekce. Byla sledována rovněž koncentrace uvolněného 2-hydroxyibuprofenu do živného média v průběhu fytoextrakce ibuprofenu. Při nižší výchozí koncentraci se do živného média uvolnilo látkové množství odpovídající 15 % přijatého ibuprofenu a při vyšší výchozí koncentraci 18 %. Sledována byla rovněž i biochemická odpověď rostliny, zejména aktivita enzymů souvisejících s oxidačním stresem. U všech zkoumaných xenobiotik byly pozorovány známky zvýšeného oxidačního stresu způsobeného jejich vlivem na rostlinu.

Zvolená metoda se ukázala být efektivnější pro léčiva nežli pro polární metabolit ibuprofenu, pravděpodobně z důvodu jeho vyšší rozpustnosti ve vodě. Uvolňování metabolitu během fytoextrakce ibuprofenu může představovat omezení v jejím budoucím využití.

Klíčová slova: Fytoextrakce, ibuprofen, ketoprofen, hydroxyibuprofen, enzymová odpověď

Abstract

Phytoextraction is an example of a method of removal of chemical pollutants from the environment. The objective of this thesis was the possibility of the removal of selected pharmaceuticals and one pharmaceutical metabolite through maize (*Zea mays*) growth. The main point of interest was the group of pharmaceuticals called NSAIDs. One of the chosen pharmaceuticals being ibuprofen, whose initial concentration in the growing medium of 5 mg/l was lowered in 9 days by 99 % and from the initial concentration of 10 mg/l of the same pharmaceutical by 77 %. The possibility of phytoextraction of the metabolite 2-hydroxyibuprofen was also examined. From its initial concentration of 5 mg/l the concentration was lowered by 47 % in 9 days. The last examined xenobiotic was ketoprofen whose initial concentration of 5 mg/l was lowered by 89 % in 9 days.

The concentration of pharmaceuticals accumulated in the plant body during the cultivation was assessed. The values of concentration were higher in the shoot system and were dispersed in the magnitude of hundreths of mg of the pharmaceutical per g of fresh plant weight. In the root system the values fell into the magnitude of thousandths of mg per g of fresh plant weight. The concentration of accumulated 2-hydroxyibuprofen fell under the limit of detection. The concentration of 2-hydroxyibuprofen released into the surroundings of the plant during the phytoextraction of ibuprofen was also assessed. During the experiment with the lower initial concentration 15 % of the dose intaken by the plant was released into its surroundings and during the experiment with the higher initial concentration it was 18 %. The biochemical response of the plant was examined as well. It was observed that all of the examined xenobiotics caused higher oxidative stress to the plants.

The chosen method has been proven to be more effective for the pharmaceuticals than for the more polar metabolite of ibuprofen probably because of its higher solubility in water. The release of the metabolite during the phytoextraction of ibuprofen may impose a limitation for future use of the method.

Key words: Phytoextraction, ibuprofen, ketoprofen, hydroxyibuprofen, enzymatic response [IN CZECH]

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za jeho trpělivý přístup při vedení mé práce a za poskytnutí cenných rad během jejího vypracování. Rovněž bych chtěl poděkovat RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za mnohé rady a za pomoc během vypracování praktické části práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. za potřebnou pomoc během práce v biochemické laboratoři.

Obsah

Obsah

Abstrakt 3
Abstract 4
Poděkování 5
Obsah 6
Použité zkratky 8
1. Úvod 9
2. Literární přehled 10
2.1. Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID) 10
2.1.1. Ibuprofen 11
2.1.2. Ketoprofen 14
2.2. NSAID v životním prostředí 15
2.2.1. Ibuprofen v životním prostředí 16
2.2.2. Ketoprofen v životním prostředí 19
2.3. Fytoremediace 20
2.4. Antioxidační systém rostlin 22
3. Cíle práce 24
4. Použité materiály 25
4.1. Chemikálie 25
4.2. Přístroje 26
4.3. Rostlinný materiál 27
5. Experimentální část 27
5.1. Kultivace rostlin 27
5.2. Extrakce kontaminantů rostlinami 28
5.2.1. Fytoextrakce ibuprofenu, hydroxyibuprofenu a ketoprofenu 28
5.2.2. Kultivace za účelem stanovení extrahovatelných reziduí 28
5.3. Analýza vzorků pomocí HPLC/UV 29
5.4. Biochemická analýza účinků xenobiotik 30
5.4.1. Stanovení peroxidace lipidů 30
5.4.2. Šikimátdehydrogenasa 30
5.4.3. Celkové peroxidasy 31
5.4.4. Membránově vázané peroxidasy 31
5.4.5. Stanovení množství proteinů dle Bradforda 31

5.4.6. Nativní elektroforéza ... 32
5.4.6.1. Příprava gelů pro elektroforézu ... 32
5.4.6.2. Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy ... 32
5.4.6.3. Detekce aktivity celkových peroxidas ... 33
5.4.6.4. Detekce aktivity glutathion-S-transferas ... 33
5.4.6.5. Detekce aktivity NADPHoxidasy ... 34
6. Výsledky ... 35
6.1. Kalibrace ... 35
6.2. Fytoremediace ... 35
6.3. Analýza kultivačního média při fytoextrakci ibuprofenu ... 39
6.4. Stanovení extrahovatelných reziduí ... 40
6.5. Biochemická analýza účinků xenobiotik ... 40
6.5.1. Peroxidace lipidů ... 40
6.5.2. Aktivita šikimátdehydrogenasy ... 41
6.5.3. Aktivita celkových peroxidas ... 42
6.5.4. Aktivita membránově vázaných peroxidas ... 43
6.5.5. Detekce aktivity glutathion-S-transferas ... 44
6.5.6. Detekce aktivity NADPHoxidasy ... 45
6.5.7. Stanovení množství proteinů dle Bradforda ... 46
7. Diskuse ... 47
8. Závěr ... 50
9. Seznam použité literatury a informačních zdrojů ... 51

Použité zkratky

AMP	2-amino-2-methylpropanol
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CoA	koenzym A
COX	cyklooxygenasa
DAB	3,3´-diamidobenzidin
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DTT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
JNK	c-Jun-N-terminální kinasy
K_A	disociační konstanta
K_{ow}	rozdělovací koeficient oktanol/voda
MDA	malondialdehyd
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	nitro blue tetrazolium chlorid
NSAID	nesteroidní antiflogistika
PGE_2	prostaglandin E_2
PMS	fenazinmethosulfát
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
RQ	rizikový koeficient
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	*N,N,N´,N´*- tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření
v/v	objemová koncentrace
w/v	hmotnostní koncentrace

1. Úvod

Prodlužující se střední délka života, spojená s vyšším výskytem civilizačních i přirozených nemocí, stojí za úměrně rostoucím počtem spotřebovaných léčiv[17]. Zbytky léčiv společně s jejich metabolity mohou po jejich požití proniknout do životního prostředí. Ke zmíněnému jevu dochází zejména při vylučování léčiv z těla močí. V menší míře mohou nespotřebovaná léčiva kontaminovat životní prostředí z důvodu nesprávné likvidace zbylých léčiv. Oba zmíněné způsoby jsou redukovány pomocí čistíren odpadních vod, leč k plnému odstranění xenobiotik z kanalizačních vod často nedochází a xenobiotika se tak mohou dostat až do povrchových vod[1].

Potenciální rizika spojená s únikem farmak a jejich metabolitů do životního prostředí představují narůstající problém na poli ekotoxikologie. Dopad na životní prostředí způsobený rezidui farmak a jejich metabolitů byl uznán celosvětovým problémem zejména z důvodu detekce přítomnosti farmak a jejich metabolitů ve všech vodních ekotoxikologických oddílech. Samotnému vylučování farmak a jejich metabolitů z těla pomocí moči je nemožné zabránit, ale je třeba usilovat o minimalizaci následků v ekosystému[2].

Ačkoliv je problematika znečištění životního prostředí farmaky a jejich metabolity diskutovaným tématem už několik desetiletí[3], jejich vliv na konkrétní organismy, populace či společenství je dodnes často z většiny neznámý[4].

2. Literární přehled

2.1. Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID)

Nesteroidní protizánětlivá léčiva neboli nesteroidní antiflogistika (NSAID) je skupina léčiv, která je možno využít jako analgetika, antipyretika a antiflogistika. Dvěma nejčastěji distribuovanými zástupci léčiv ze skupiny NSAID jsou kyselina acetylsalicylová a ibuprofen. Skupina NSAID se vyznačuje vysokou strukturní různorodostí. Látky ze skupiny NSAID jsou distribuovány pod velkým množstvím různých obchodních názvů. Často jde o léky dostupné bez lékařského předpisu[5].

Nesteroidní protizánětlivá léčiva inhibují 2 izoformy enzymu cyklooxygenasy (COX-1 a COX-2), které hrají klíčovou roli během syntézy prostaglandinu E_2 (PGE_2). V místech účinku tedy zvyšují práh aktivace přítomných nociceptorů. Díky tomu dochází k jejich analgetickému a antiflogistickému účinku[6].

Antiflogistický účinek je ovlivněn jejich kyselou povahou a jejich častým vazbám na proteiny. Při zánětu dochází k úniku plazmy z kapilár do extracelulárního prostoru a ke snížení pH v zánětlivém ložisku. Snížení pH a přítomnost plazmy způsobí zvýšení koncentrace aktivní formy NSAID v místě zánětu. Podané léčivo díky tomu působí protizánětlivým účinkem přímo v postiženém místě[6].

Za účelem akutní analgesie nejsou nízké dávky NSAID efektivní, proto jsou často podávány ve vyšších denních dávkách, v pravidelných intervalech, které jsou stanoveny pro konkrétní léčiva[6].

Mimo jejich běžného využití jako analgetika jsou pro jejich kombinovaný účinek často využívána před, během i po chirurgických zákrocích. Za účelem snížení pooperační bolesti je častá jejich kombinace s opioidy, se kterými byl pozorován aditivní či synergický účinek[6].

Zejména při dlouhodobém užívání mohou mít látky ze skupiny NSAID různé nežádoucí účinky. Jedním z nežádoucích účinků NSAID jsou komplikace gastrointestinálního traktu, především zvýšené riziko vředových chorob. Dalšími nežádoucími účinky jsou rovněž poruchy kardiovaskulárního, renálního a hepatického charakteru[6].

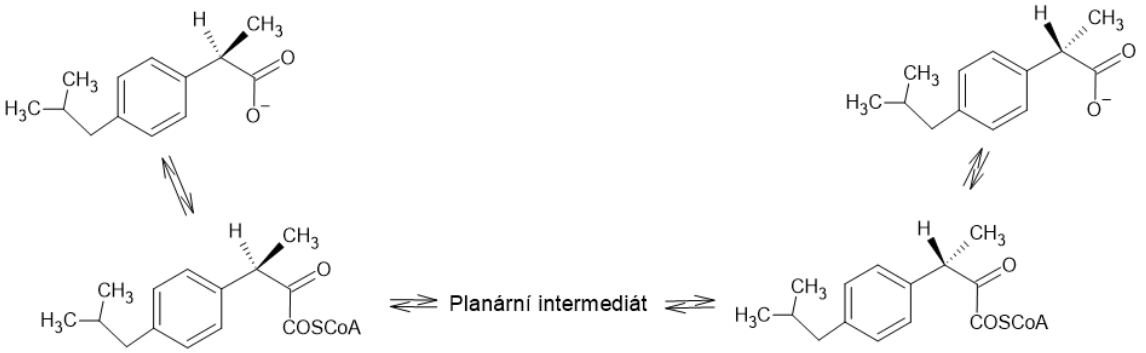
2.1.1. Ibuprofen

Ibuprofen je jednou z nejpoužívanějších látek řadících se mezi NSAID. Za minulý rok 2023 se na území České republiky stal léčivý přípravek s obsahem ibuprofenu pro perorální podání nejpoužívanějším léčivým přípravkem dle počtu dodávek do lékáren a jiných zdravotnických zařízení[16]. V porovnání s ostatními látkami dané skupiny má nižší riziko vážných nežádoucích účinků a nižší toxicitu. Běžně předepisovaná denní dávka pro krátkodobou léčbu se pohybuje v rozmezí 800 až 1200 mg za den. Ve vyšších dávkách, například za účelem dlouhodobé léčby revmatických chorob, se dávka může pohybovat v rozmezí 1200 až 2400 mg za den[7].

Po perorálním podání se ibuprofen absorbuje poměrně rychle. Nejvyšší hodnoty nabývá koncentrace léčiva v plazmě či séru mezi první a druhou hodinou po podání. Daná hodnota se může lehce měnit v závislosti na lékové formě[7-8]. Po perorálním podání dochází k rapidnímu navázání na lidský sérový albumin, což ovlivňuje velikost farmakologicky relevantní dávky léčiva[8]. Ibuprofen vykazuje předvídatelnou a spolehlivou kinetiku vyplývající z podobnosti závěrů provedených studií[7].

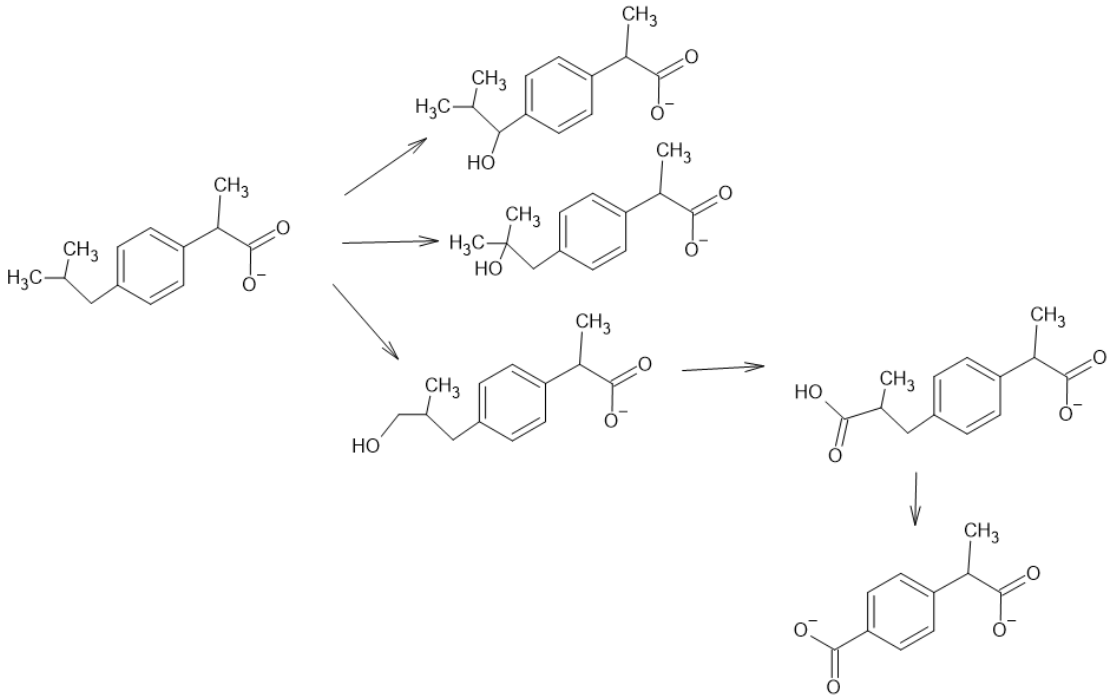
Kromě inhibice syntézy prostaglandinu vykazuje ibuprofen analgetické účinky zároveň i na prostaglandinu nezávislými cestami. Například blokuje aktivitu sodíkových kanálů Na_V 1.7 a 1.8, čímž snižuje citlivost přítomných nociceptorů[10].

Ve většině lékových forem se ibuprofen podává v diastereoizomerní směsi enantiomeru R(–) a S(+)[7]. Enantiomer S(+) inhibuje syntézu prostaglandinu. Enantiomer R(–) není tak aktivní při inhibici syntézy prostaglandinu, ale může mít jiné protizánětlivé účinky. Okolo 40-60 % enantiomeru R(–) je přeměněno na enantiomer S(+) v prostředí intestinálního traktu a v játrech. Prvním krokem daného procesu je aktivace enantiomeru R(–) pomocí ATP:Mg^{2+}. Tím je získán AMP-derivát, ten následně podléhá esterifikaci pomocí koenzymu-A. Reakce je katalyzována acyl-CoAsyntetasou. Získaný R-ibuprofen-CoA epimerizuje za vzniku S-ibuprofen-CoA (viz obrázek 1). Reakci katalyzuje epimerasa. Tato sloučenina hydrolyzuje za vzniku S(+) enantiomeru ibuprofenu. Reakci katalyzuje hydrolasa[7-8].



Obrázek 1: Přeměna R-(–)-ibuprofenu na S-(+)-ibuprofen; převzato ze [7] a upraveno v programu ChemSketch

Metabolismus ibuprofenu v lidském organismu lze dělit na dvě fáze. V první fázi figuruje primárně katalýza cytochromy P450, a to 2C9, 2C8 a 2C19. Dochází k hydroxylaci isobutylového řetězce ibuprofenu za vniku 1,2 a 3-hydroxyderivátu, ten je následně oxidován za vzniku 3-karboxyibuprofenu a *p*-karboxy-2-fenylpropionátu (viz obrázek 2)[7].



Obrázek 2: První fáze metabolismu ibuprofenu; převzato z [7] a upraveno v programu ChemSketch

Během druhé fáze dochází k tvorbě fenolických a acylových glukuronidů. V menší míře dochází ke konjugaci s taurinem, který vykazuje stereospecifitu vůči S(+) enantiomeru[7].

Celková exkrece do žluči zahrnující množství nezměněného léčiva, produktů první i druhé fáze, odpovídá zhruba 1 % původní podané látky. V moči odpovídá množství vyloučeného nezměněného ibuprofenu v součtu s produkty druhé fáze metabolismu zhruba 10 % původní dávky přijatého ibuprofenu. Množství vyloučených produktů první fáze v moči odpovídá 40 % původní podané dávky ibuprofenu[9]. Jiné studie uvádí i odlišná čísla. Příkladem mohou být hodnoty pro vylučování v moči odpovídající 15 % nemetabolizovaného ibuprofenu, 26 % 2-hydroxyibuprofenu a 43 % 3-karboxyibuprofenu. Data ale souhlasí s tendencí, že stabilní produkty první fáze metabolismu převažují nad ostatními metabolity[25].

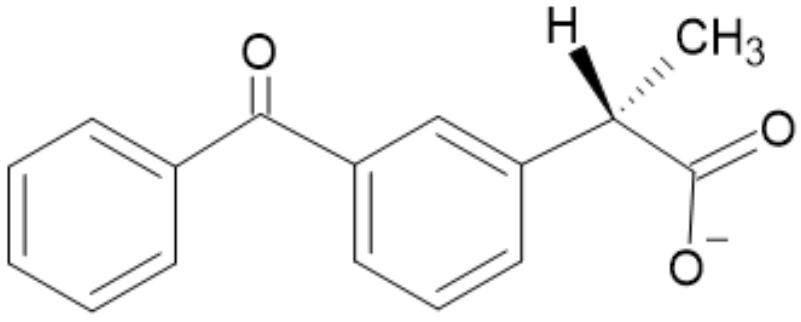
Metabolismus ibuprofenu je ovlivněn věkem, zdravotním stavem i genetickými predispozicemi[7].

2.1.2. Ketoprofen

Ketoprofen je široce rozšířené léčivo využívané k léčbě zánětů, horečky, bolesti svalů, kostí a kloubů[12]. Běžná denní dávka se při perorálním podání pohybuje v rozmezí 200 až 300 mg. Z důvodu vyšší inhibice COX-1 oproti ibuprofenu se s účinky ketoprofenu pojí více nežádoucích účinků jako například obstrukce dýchacích cest, riziko vředových onemocnění gastrointestinálního traktu, renální poruchy a jiné obvyklé nežádoucí účinky nesteroidních antiflogistik[14]. Po perorálním podání se ketoprofen vyznačuje rychlým vstřebáváním. V případě podání tablety se standardní rychlostí uvolňování dosahuje maximální koncentrace ketoprofenu v plazmě po uplynutí 0,8 až 2,4 hodiny. V případě sirupu je maximální koncentrace dosaženo po uplynutí 0,35 až 1,2 hodiny. Po perorálním podání dochází k rapidnímu navázání na sérové proteiny z více než 95 %, díky čemuž se nachází primárně v plazmě[11].

Ketoprofen je opticky aktivní látka. Pouze S(+) enantiomer je farmakologicky aktivní[11]. Podobně jako v případě ibuprofenu může dojít k přeměně R(–) enantiomeru na S(+). Reakce ale probíhá v malém rozsahu. Dle některých studií je její rozsah zanedbatelný[13].

Většina ketoprofenu je v játrech metabolizována na acyl-glukuronidové konjugáty v rozsahu 50-80 % množství původní dávky ketoprofenu. Ty snadno podléhají hydrolýze a dochází po vyloučení z těla k opětovnému uvolnění ketoprofenu z glukuronového konjugátu. Samotný nepozměněný ketoprofen je močí vylučován v nízkém množství[14].



Obrázek 3: Strukturní vzorec S-(+)-ketoprofenu vytvořen v programu ChemSketch

2.2. NSAID v životním prostředí

Skupina NSAID je jednou z nejpoužívanějších skupin léčiv na světě v oblasti humánní i veterinární medicíny. Představuje tak značný problém z hlediska zatížení životního prostředí[15]. Léčiva uvolňovaná do vodního prostředí pochází primárně z odpadních vod domácností, nemocničních zařízení a továren. Do půdy, kde byla léčiva nalezena v sedimentech, povrchových půdách i v zemědělské ornici, jsou přímo vylučována hospodářskými zvířaty[23]. Situaci může potenciálně zhoršit využití zvířecího trusu s vysokým obsahem xenobiotik jako hnojiva, kdy dochází k jeho distribuci po rozsáhlé ploše a k jeho vstřebávání do půdy[34]. Tato cesta má přímou vazbu na veterinární využití NSAID. K uvolňování do půdy dochází i skrze likvidaci léků s obsahem NSAID do komunálního odpadu. Z něj dochází k uvolnění xenobiotika po přemístění odpadu na skládku[23]. Koncentrace léčiv řadících se do skupiny NSAID se v životním prostředí stále zvyšuje. Například na vybraných místech povodí řeky Labe vzrostla koncentrace vybraných nejčastěji užívaných NSAID mezi lety 2000 a 2017 více než desetkrát na hodnotu pohybující se okolo desítek, stovek a někdy i tisíců ng/l [15].

Role a důsledky NSAID v životním prostředí a jejich vliv na necílové organismy jsou v řadě případů neznámé[21]. Ačkoliv pro lidský organismus vykazují nízkou toxicitu, u některých NSAID byly zpozorovány závažnější nežádoucí účinky na životní prostředí. Tyto efekty se u jednotlivých léčiv ze skupiny NSAID liší[15].

Kromě fyzikálních faktorů je nejvýznamnější cestou odstranění NSAID z vodních prostředí jejich mikrobiální degradace na jednoduché organické molekuly. Čistírny odpadních vod jsou důležitým faktorem v odstraňování NSAID z vodního prostředí. Jejich efektivita je ale velmi proměnlivá a závisí na jejich aktuálním stavu a na konkrétním léčivu[15].

Sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností a vyšším rozdělovacím koeficientem oktanol-voda, respektive hodnotou jeho dekadického logaritmu ($\log K_{ow}$), se obecně lépe sorbují na půdní částice. V půdě potom dochází k rychlejší biodegradaci z důvodu přítomnosti aktivních mikroorganismů. Pro mnohé zástupce léčiv z řady NSAID jsou tyto podmínky splněny v dostatečné míře. Například v případě ibuprofenu či diklofenaku, dvou velmi významných polutantů prostředí ze skupiny NSAID, nabývá jejich hodnota $\log K_{ow}$ hodnoty vyšší než 4, kterou lze pro efektivní sorpci v půdě považovat za dostatečnou[17].

Hodnoty logK_{ow} mohou téže souviset s rizikem bioakumulace. U běžně používaných NSAID, zejména u ibuprofenu, diklofenaku a nimesulidu, byla například zaznamenána bioakumualce v tkáni mlže druhu *Mytilus galloprovincialis*[19].

Monitoring znečištění prostředí léčivy ze skupiny NSAID komplikuje jejich interakce v organismech. Stanovení přesné koncentrace znečišťujících léčiv může být ovlivněno tvorbou konjugátů či jiných metabolitů, která ovlivňuje získané výsledky[19]. V některých případech mohou i samotné metabolity léčiv působit jako závažnější polutanty než původní léčiva[22].

Skupina NSAID vykazuje velmi vysoké hodnoty rizikového koeficientu (RQ) zejména ve vodním prostředí. V porovnání s ostatními skupinami běžně užívaných léčiv vykazují nejvyšší maximální i mediánové hodnoty RQ. Zejména například ibuprofen vykazuje v porovnání s ostatními léčivy výrazně vyšší hodnoty RQ, vyplývající ze sledování jeho vlivu na vodní bezobratlé či paprskoploutvé[22].

2.2.1. Ibuprofen v životním prostředí

Koncentrace ibuprofenu ve vodních tocích i v půdách se v závislosti na zeměpisné poloze liší. Ve vodním prostředí se koncentrace řádově pohybuje od zhruba jednotek ng/l po jednotky µg/l, jinými slovy tedy od koncentrací jednotek ppt po koncentrace jednotek ppb. V půdní fázi se hodnoty pohybují od zhruba stovek ng/kg po stovky µg/kg[23]. Například nejvyšší zveřejněná koncentrace v toku Labe dosáhla hodnoty 3,210 µg/l[15].

Vylučováním v moči je člověkem do životního prostředí uvolňováno malé množství původně přijatého ibuprofenu (viz 2.1.1). Jeho menší množství je uvolněné v podobě konjugátů s kyselinou glukuronovou, vzniklé během druhé fáze metabolismu, které v životním prostředí hydrolyzují. Na životní prostředí mají vliv zejména produkty první fáze metabolismu[23].

Metabolity mohou volně interagovat s látkami přítomnými v odpadních vodách některých chemických závodů, a vytvářet tak nebezpečnější sloučeniny, jakými jsou například 1-(4-isobutylfenyl)-1-ethanol, 1-ethyl-4-(1-hydroxy)isobutylbenzen, 2-[4-(1-hydroxyisobutyl)fenyl] propionová kyselina, 4-ethylbenzaldehyd, nebo 4-ethylfenol[23].

V některých případech může být ibuprofen přeměněn na sloučeniny, které jsou samy o sobě toxičtější než samotný ibuprofen. Příkladem může být ibuprofen konjugovaný s diacylglycerolem, u kterého bylo prokázáno, že zamezuje buněčnému dělení a zabraňuje rozestupování chromozomových párů[24]. Dalším příkladem může být snížené odbourávání hydroxyderivátů ibuprofenu oproti jeho ostatním metabolitům. Bylo zjištěno, že humánní metabolity 1-hydroxyibuprofen, 2-hydroxyibuprofen a 1,2-dihydroxyibuprofen se oproti ostatním metabolitům rozkládají podstatně pomaleji[25]. Kvůli uvedeným poznatkům se v současné době předpokládá potenciální toxicita hydroxyderivátů ibuprofenu pro některé organismy. Do budoucna bude třeba tuto možnost experimentálně prověřit[24].

Většina dávky podaného ibuprofenu je člověkem močí vyloučena v podobě 2-hydroxyibuprofenu a 3-karboxyibuprofenu. Jelikož z těchto dvou metabolitů je 3-karboxyibuprofen v životním prostředí méně stálý, tvoří hlavní kontaminanty vylučované močí 2-hydroxyibuprofen a samotný ibuprofen. V některých případech byly v životním prostředí naměřeny mnohem vyšší koncentrace 2-hydroxyibuprofenu než ibuprofenu, a to až stošedesátkrát. Metabolit se od ibuprofenu liší fyzikálními vlastnostmi. Jeho hodnota logK_{ow} činí pouze 2,41. Jeho záporný dekadický logaritmus disociační konstanty pK_A činí 4,63 oproti 4,9 v případě ibuprofenu. Tyto rozdíly mohou stát za rozdílnou distribucí látek v ekosystému[26]. Vyšší koncentrace produktů první fáze metabolismu ibuprofenu oproti ibuprofenu samotnému byla zaznamenána i v českých odpadních vodách. Odlišná povaha 2-hydroxyibuprofenu rovněž komplikuje jeho odstraňování v čistírnách odpadních vod[27].

Lipofilita a poměrně nízká biodegradovatelnost způsobená přítomností aromatického kruhu s jednou obsazenou polohou para a tendence k bioakumulaci, činí z ibuprofenu pro organismy životního prostředí potenciálně nebezpečný polutant. Největší nebezpečí představuje pro vodní organismy.

Během testů chronické toxicity u paprskoploutvého druhu *Brachydanio rerio*, sledujících vliv koncentrace ibuprofenu odpovídající koncentracím v životním prostředí, bylo shledáno, že ibuprofen může být potenciálním zdrojem volných radikálů, neboť v tkáních zkoumaných jedinců došlo k oxidačnímu stresu. U embryí nastaly rovněž problémy s líhnutím, objevily se kosterní deformace, hypopigmentace, kardiovaskulární problémy i oxidační stres. V larválním stádiu způsoboval změny chování vůči teplu. Tím bylo prokázáno, že ibuprofen může negativně působit na vodní organismy i při nízkých dávkách odpovídajících skutečným koncentracím v životním prostředí[23].

Amfifilní povaha způsobuje silnou tendenci k interakci s fosfolipidovou dvojvrstvou u vybraných bakterií. V membráně docházelo působením ibuprofenu k modifikaci membránových molekul[28].

Bylo pozorováno, že oba enantiomery se liší ve svých ekotoxikologických účincích. V systémech sediment-voda bylo pozorováno rychlejší odbourávání R(–) enantiomeru oproti S(+)[23].

Toxikologické účinky ibuprofenu a jeho metabolitů v životním prostředí jsou povahově různé. Zaznamenán byl oxidační stres zapříčiněný i samotným ibuprofenem i v kombinaci s ostatními NSAID v raných vývojových stadiích paprskoploutvého druhu *Tinca tinca* při enviromentálních koncentracích[29]. Peroxidace lipidů a oxidační stres byly pozorovány také v žábrách mlže druhu *Mytilus galloprovincialis*[20].

Ve vícero případech byl pozorován vliv ibuprofenu na endokrinní systém. Při koncentracích 5 a 10 mg/l a v kombinaci s jinými léky bylo pozorováno snížení celkových vitellogeninů a porucha funkce vitellogenních oocytů u korýše druhu *Neohelice granulata*. Předpokládá se podobný účinek při dlouhodobé expozici a environmentálně relevantních koncentracích[30]. Při studiu vlivu na buňky H295R byla pozorována vyšší aktivita aromatasy a vyšší koncentrace estradiolu. U paprskoploutvého druhu *Oryzias latipes* byly zpozorovány vyšší hodnoty vitellogeninu v plazmě samců[32].

U ibuprofenu byly rovněž zaznamenány negativní účinky na rozmnožování. U paprskoploutvého druhu *Oryzias latipes* bylo pozorováno pozdější líhnutí jiker[32]. U pulců obojživelníka druhu *Bufo bufo* byly zaznamenány deformace, snížená tělesná váha a oddálená metamorfóza, mutagenita a indukovaná apoptóza při environmentálně relevantních koncentracích[31]. Rovněž byl pozorován negativní vliv na gamety ostnokožce druhu *Psammechinus miliaris*.[21] Genotoxicita a vliv na aktivitu antioxidačních enzymů byla zpozorována u sladkovodního mlže druhu *Dreissena polymorpha* při environmentálně relevantních koncentracích[24]. Genotoxicita byla rovněž zaznamenána u slanovodního mlže druhu *Mytilus galloprovincialis* společně s oslabením imunitního systému, oxidačním stresem a bioakumulací v tkáních[19].

Metabolismus ibuprofenu v tělech vyšších rostlin může probíhat komplikovaněji než v těle lidském. Obecně má metabolismus v rostlinách tři fáze. První fáze se shoduje s první fází metabolismu ibuprofenu v lidském těle, tedy dochází k tvorbě polárnějších oxidovaných metabolitů. Druhá fáze je opět analogická. Během ní dochází k tvorbě konjugátů s endogenními polárními molekulami, jakými jsou například aminokyseliny,

glutathion, nebo sacharidy. Třetí zahrnuje distribuci metabolitů do zásobních kompartmentů, kterými mohou být buněčná stěna či vakuoly. Studie vlivu ibuprofenu na rostlinu *Arabidopsis thaliana* ukázala, že v těle rostliny byl ibuprofen metabolizován na více než 300 metabolitů. Nejčastějším metabolitem první fáze byl 2-hydroxyibuprofen, který byl zaznamenán v nejvyšší koncentraci v mezibuněčném prostoru rostliny a v nižším množství v živném médiu. Nezměněný ibuprofen byl nalezen pouze v živném médiu ve zbytkovém množství. Největší skupinou metabolitů byly glykosylové konjugáty ibuprofenu a jeho derivátů. Druhé nejvyšší zastoupení měly methylované deriváty. Ačkoliv má methylace negativní vliv na zvyšování polarity molekuly, zvyšuje její těkavost. Nejčastějším methylovaným produktem metabolismu byl methyl-ester 2-hydroxyibuprofenu. Třetí největší skupinou byly konjugáty s aminokyselinami. Rostlina přijala téměř veškerý ibuprofen z okolí. Bylo zjištěno, že 81 % metabolitů ibuprofenu bylo uloženo do vakuol. Zbylých zhruba 19 % metabolitů bylo uvolněno do okolí. Většina uvolněných metabolitů ale vykazovala nižší toxicitu než ibuprofen samotný[33].

2.2.2. Ketoprofen v životním prostředí

Koncentrace ketoprofenu ve vodních tocích i v půdách se v závislosti na zeměpisné poloze liší. Ve vodním prostředí se koncentrace řádově pohybuje od zhruba jednotek ng/l po jednotky, maximálně desítky μg/l, jinými slovy tedy od koncentrací jednotek ppt po koncentrace jednotek ppb[34]. Například nejvyšší koncentrace ketoprofenu naměřená v toku povodí Labe měla hodnotu 929,8 ng/l[15]. Znečištění ketoprofenem je celosvětově rozšířené a jeho přítomnost byla naměřena například i ve vodách Antarktidy[34].

Přítomnost různorodých funkčních skupin v molekule způsobuje její nízkou sorpci na površích, a naopak snadnou desorpci. Přítomnost karboxylové skupiny znesnadňuje oxidační katabolismus.[34] Jeho amfifilní charakter, daný hodnotou záporného dekadického logaritmu disociační konstanty pK_A stanovené na intervalu 4,5 až 5,7 a hodnotou záporného dekadického logaritmu rozdělovací konstanty oktanol-voda logK_{ow} na intervalu 3,1 až 4,0, vysvětluje nízkou sorpci a zároveň schopnost pronikat biologickými membránami[35]. Díky prostupu membránami je schopen se selektivně vázat na proteiny uvnitř buněk, čímž znemožňuje jejich

správnou funkci. Díky svým fyzikálním i chemickým vlastnostem vykazuje značnou bioakumulaci i biomagnifikaci v ekosystémech[34].

Ketoprofen byl rozpoznán jako významný zdroj oxidačního stresu v mnohých organismech. Fotolýzou ketoprofenu dochází ke vzniku ketylového radikálu, který představuje významné riziko, pakliže dojde k jeho utvoření uvnitř buněčné membrány. Dochází totiž k oxidačnímu stresu lipidů uvnitř membrány a k vážnému narušení její funkce[34]. Fotolýza ketoprofenu může produkovat i jiné molekuly, například 3-ethylbenzofenon. Toxicita ketoprofenu se po ozáření slunečním světlem může zvýšit až dvanáctkrát a zůstat na zvýšené úrovni. Dané poznatky naznačují, že by fotolýzou mohly vznikat další doposud neznámé a stabilní toxické deriváty ketoprofenu[35].

Biologická degradace představuje zdaleka nejvýznamnější způsob odstraňování ketoprofenu z vodní fáze životního prostředí. Významně efektivní se ukázaly být zejména houby či bakterie[34].

Bylo pozorováno několik konkrétních případů toxických účinků ketoprofenu na organismy životního prostředí. U mlže druhu *Mytilus galloprovincialis* byly zaznamenány imunologické poruchy, genotoxicita a oxidační stres[19]. U embryí paprskoploutvého druhu *Brachydanio rerio* byly zaznamenány vývojové deformace, kardiovaskulární problémy, opožděné líhnutí jiker a smrt. U dospělců stejného druhu bylo pozorováno snížení aktivity Na^+/K^+-ATPasy a oxidační stres[38]. U paprskoploutvého druhu *Liza ramada* byla prokázána akumulace v tkáni srdce[37]. Sledován byl i oxidační stres obilniny druhu *Hordeum*[36]. U zelené řasy druhu *Scenedesmus obliquus* byla zaznamenána fotosyntetická toxicita[18]. Zkoumáním vlivu ketoprofenu z environmentálních zdrojů na lidské receptory pohlavních hormonů byl shledán být endokrinním disruptorem [39].

2.3. Fytoremediace

Fytoremediace označuje metodu odstraňování polutantů z životního prostředí pomocí růstu rostlin a přidružených mikroorganismů. Je možné ji využít pro odstranění mnohých látek jako například organických polutantů, těžkých kovů nebo radionuklidů. Mezi její přednosti patří zejména její nízká cena, estetický přínos, vysoká efektivita, příznivost vůči životnímu prostředí, aplikovatelnost *in situ* a závislost pouze na energii slunečního svitu a teplu. Rostliny zpravidla snižují koncentraci polutantů ve svém okolí

a zároveň zachovávají kvalitu půdy pro další možné využití. V některých případech bylo dokonce zaznamenáno zvýšení úrodnosti půdy po skončení fytoremediace[40].

Díky svým přednostem se řadí mezi preferované metody odstraňování znečištění rozsáhlého prostoru, jehož čištění konvenčními metodami by z ekonomických důvodů nebylo možné. Její cena se může pohybovat dokonce pouze okolo 5 % nákladů potřebných pro realizaci alternativních způsobů dekontaminace[40].

Účinnost fytoremediace je závislá na vícero faktorech. Množství rostlinné biomasy, prostředí růstu, konkrétní volba rostliny či vliv konkrétního xenobiotika jsou všechno zásadní faktory mající vliv na efektivitu metody. Klíčová je biochemická odpověď rostliny na přítomnost xenobiotika. Čím déle dokáže rostlina jeho přítomnosti odolávat, tím déle bude moci fytoremediace efektivně probíhat[40].

Pojem fytoremediace označuje několik technik, které konkretizují její proces. Techniky fytoremediace se primárně rozlišují podle účelu, za jakým je fytoremediace prováděna. Fytoextrakce označuje akumulaci polutantů z životního prostředí v těle rostliny za účelem její následné sklizně. Fytofiltrace označuje snižování koncentrace polutantů ve vodním prostředí pomocí rostlin. Fytostabilizace označuje omezování mobility a biologické dostupnosti polutantů v půdě pomocí rostlin. Fytovolatilizace označuje přeměnu xenobiotik přijatých z okolního prostředí rostlinou na více těkavé deriváty, které jsou následně uvolněny do atmosféry. Fytodegradace označuje biodegradaci xenobiotik přijatých z okolního prostředí rostlinou v těle rostliny. Rhizodegradace označuje biodegradaci organických xenobiotik pomocí rhizosférních mikroorganismů. Fytodesalinace označuje odstranění nepřirozeně vysokých koncentrací solí v půdě za pomoci halofytů[40]. Předmětem zájmu bakalářské práce jsou zejména fytoextrakce, fytofiltrace a případně fytodegradace z důvodu možnosti jejich aplikace na organické polutanty.

Z hlediska následného hospodářského využití půdy, jež prošla fytoremediací, je tato metoda výhodná ze tří důvodů. Prvním je fytostabilizace ve smyslu omezení šíření akutního rizika. Druhým důvodem je fytoextrakce cenných kovů za účelem jejich následného využití. Příklady mohou být nikl, thalium či hliník. Třetím důvodem je odstranění stresorů v půdě, které by mohly omezovat výnos rostlin pěstovaných v daném prostředí. Ekonomickou výhodou může být i získané množství biomasy, kterou je možno využít k výrobě bioplynu[40].

2.4. Antioxidační systém rostlin

Vystavení rostliny environmentálnímu stresu zapříčiní vznik nebezpečných reaktivních forem kyslíku hromadících se v rostlinných buňkách. Tyto částice vznikají primárně kvůli uvolňování molekulárního kyslíku během fotosystému II. Kyslík tvoří přijetím elektronu superoxidový radikál, který je velmi reaktivní. Enzym superoxiddismutasa je schopen superoxidový radikál přeměnit na peroxid vodíku. Reakcí peroxidu vodíku a superoxidového radikálu vzniká hydroxylový radikál. Tyto částice mohou oxidovat molekuly v buňkách, čímž ohrožují jejich funkčnost. Oxidace probíhá primárně buď v důsledku reakce s hydroxylovým radikálem či odtrhnutím vodíku[41].

Reaktivní formy kyslíku mohou ohrozit funkčnost mnoha různých molekul. Příkladem mohou být poškození DNA, oxidace enzymů, modifikace proteinů či peroxidace lipidů. Mechanismy poškození konkrétních molekul a konkrétních struktur bývají různorodé. Díky průběhu specifického mechanismu při oxidaci molekuly je možné v konkrétních případech sledovat uvolnění markeru specifického dané reakci. Příkladem může být uvolnění malondialdehydu při oxidačním stresu a následná peroxidace lipidů[42].

V rostlinách byl vyvinut obranný antioxidační systém, založený na aktivitě enzymových i neenzymových látek, které zmírňují účinky environmentálního stresu[41]. Jednou skupinou enzymů působících v rámci antioxidačního systému je skupina peroxidas. Skupina peroxidas je vysoce heterogenní skupina mnohých enzymů. Úlohou proxidas v organismu je především snižovat množství peroxidu vodíku, který vzniká v prostředí buněk. V některých situacích mohou naopak tvorbě peroxidu vodíku peroxidasy napomáhat. Jejich aktivita ale často souvisí s oxidativním stresem působícím na organismus. Sledováním jejich aktivity je možné sledovat míru oxidačního stresu působícího na organismus[43].

Glutathiontransferasy neboli glutathion S-transferasy jsou skupinou enzymů nacházejících se primárně v cytosolu buněk. Mají několik funkcí. Jednou z nich je konjugace elektrofilních molekul s glutathionem. Mimo jejich detoxikační funkce mají mnoho funkcí souvisejících s oxidačním stresem. Inhibují například enzymy Jun N-terminální kinasy, neboli enzymy ze skupiny JNK, čímž chrání buňky před buněčnou smrtí indukovanou peroxidem vodíku. Mají rovněž peroxidasovou aktivitu[45].

Enzym šikimátdehydrogenasa katalyzuje NADPH-dependentní redukci 3-dehydrošikimátu na šikimát. Šikimát je klíčový pro syntézu aromatických

aminokyselin a různých sekundárních metabolitů[46]. Tyto sloučeniny mohou být buňkou využity jako antioxidanty. Zmíněné aminokyseliny jsou rovněž využity na syntézu pigmentů, hormonů, různých polyfenolů či například prvků buněčné stěny. Tím je enzym šikimátdehydrogenasa přímo i nepřímo spojen s následky oxidativního stresu, a tudíž sledováním její aktivity je možné sledovat míru působeného oxidativního stresu[47].

Enzymový komplex NADPHoxidasa oxiduje molekuly NADPH za vzniku superoxidového radikálu. Jde o enzym skládající se z vícero podjednotek. Sestává z membránových i cytosolových struktur. Hraje roli v mnoha procesech od imunologické odpovědi až po regulaci genové exprese. Jeho aktivita rovněž souvisí s mírou oxidačního stresu[44].

3. Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo sledovat možnosti fytoextrakce vybraných farmak a jejich metabolitů pomocí kukuřice seté (*Zea mays*). Konkrétně byla zkoumána možnost fytoextrakce farmak ze skupiny NSAID, a to ibuprofenu a ketoprofenu. Zároveň byla zkoumána možnost fytoextrakce metabolitu ibuprofenu, a sice 2-hydroxyibuprofenu.

V souvislosti s tím byla stanovena koncentrace léčiv akumulovaných v rostlinném těle.

Dalším cílem bylo sledování koncentrace uvolněného 2-hydroxyibuprofenu do okolí rostliny během fytoextrakce ibuprofenu.

Byla rovněž sledována biochemická odpověď rostliny, zejména aktivita enzymů souvisejících s oxidačním stresem.

4. Použité materiály

4.1. Chemikálie

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (Sigma-Aldrich, USA)

2-amino-2-methylpropanol (Sigma-Aldrich, USA)

2-hydroxyibuprofen (Sigma-Aldrich, USA)

3,3´-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril, gradient grade, for HPLC, ≥99.9% (Honeywell, USA)

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)

Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)

Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol, p.a. 96% (Lach-Ner, ČR)

Ethyl-acetát (Lach-Ner, ČR)

Ethylendiamintetraoctan disodný dihydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Fenazinmethosulfát (Sigma-Aldrich, USA)

Glutathion (Sigma-Aldrich, USA)

Glycerol bezvodý (Lach-Ner, ČR)

Glycin (Lach-Ner, ČR)

Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)

Hydroxid sodný (Penta, ČR)

Chlorid hořečnatý hexahydrát (Lach-Ner, ČR)

Chlorid sodný (Penta, ČR)

Chlorid vápenatý (Lach-Ner, ČR)

Iburpofen (Zentiva, ČR)

Ketoprofen (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR)

Kyselina trihydrogenfosforečná, ≥ 85% (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich, USA)

Malondialdehyd (Sigma-Aldrich, USA)

Methanol, gradient grade, for HPLC, ≥99.9% (Honeywell, USA)

Mořský písek (Lach-Ner, ČR)

N,N,N´,N´-tetramethyletylendiamin (Thermo, Japonsko)

Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (Sigma Aldrich, USA)

Nitro blue tetrazolium chlorid (Sigma-Aldrich, USA)

Peroxid vodíku 30% (Lach-Ner, ČR)

Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)

Polyvinylpolypyrrolidon (Sigma-Aldrich, USA)

Sacharóza (Penta, ČR)

Savo Original (Unilever s.r.o., Velká Británie)

Síran sodný bezvodý (Lach-Ner, ČR)

Šikimát (Sigma-Aldrich, USA)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (VWR Life Science, USA)

4.2. Přístroje

ACD/ChemSketch (Freeware) (ACD/Labs, verze 2020.1.2)

Analytické váhy ABT 120-5DNM (KERN, Německo)

Centrifuga Minispin (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Spectrafuge TM 16M (Labnet, USA) – 14000 otáček/min, průměr rotoru 100 mm

Centrifuga Universal R32 (Hettich, Německo) – 16000×g

Clarity software (Data Apex, verze 8.5)

Čtečka mikrotitračních destiček Multiscan go (Thermo Scientific, USA)

Elektroforetická souprava (Bio-Rad, USA)

HPLC (Shimadzu, Japonsko) - vysokotlaké čerpadlo LC20AD, UV detektor SPD 20 A, nástřik kohoutem Rheodyne (IDEX corporation, USA), HPLC kolona Agilent Eclipse XDB-C-18, 5 μm, 250 x 4 mm (Agilent, USA)

Kahan Fuego (WLD-TEC, Německo)

Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu (Labox, ČR)

Mrazicí box (Liebherr, Německo)

Přístroj pro přípravu ultračisté vody IWA 5 rosol (Watek, ČR)

Tlakový hrnec (Morphy Richards, Velká Británie)

Ultrazvuková lázeň (Fisherbrand, Velká Británie)

UV/VIS Spektrofotometr Ultrospec 2100 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

4.3. Rostlinný materiál

Kukuřice setá (Zea mays), kultivar DKC 3969 (Monsanto, ČR)

5. Experimentální část

5.1. Kultivace rostlin

Odtočená vodovodní voda byla vysterilizována převařením v autoklávu. Za účelem sterilizace semen kukuřice seté (*Zea mays*) byla semena nejprve po dobu jedné minuty odmaštěna v 70% vodném roztoku ethanolu.

Následně byl ethanolový roztok odlit a semena sterilizována nejprve 10% vodným roztokem komerčního přípravku Savo po dobu pěti minut. Následně byl roztok Sava opět odlit a byla provedena druhá sterilizace 5% roztokem Sava po dobu deseti minut.

Následně byl roztok Sava odlit a semena byla promyta třikrát sterilní destilovanou vodou po dobu deseti minut. Oplach byl prováděn v prostředí sterilního laminárního boxu.

Sterilizovaná semena byla v prostředí laminárního boxu po šesti kusech vnesena do vysterilizovaných nezábrusových 500 ml Erlenmeyerových baněk s 5 ml sterilní vodovodní vody. Baňky byly umístěny do kultivační místnosti. Kultivace probíhala při 24 °C ve střídavém režimu světlo/tma 16 h/ 8 h. Osvětlení bylo realizováno 40W trubicí Philips Cool White ze vzdálenosti 40 cm. Baňky byly v kultivační místnosti ponechány po dobu deseti dnů. Po uplynutí pěti dnů bylo do baněk pomocí injekční stříkačky vpraveno 10 ml sterilní vodovodní vody. Injekční jehla byla sterilizována nad plamenem. Jehlou byla propíchnuta hliníková folie chránící hrdlo baňky. Fólie byla následně překryta druhou vrstvou nově sterilizované hliníkové folie. Celý proces byl prováděn v prostředí laminárního boxu.

5.2. Extrakce kontaminantů rostlinami

5.2.1. Fytoextrakce ibuprofenu, hydroxyibuprofenu a ketoprofenu

Z baněk po šesti vzrostlých rostlinách byla vylita zbylá voda. Následně bylo ke vzrostlým rostlinám přiléváno 100 ml sterilního vodného roztoku léčiva o dané koncentraci. Zvolené koncentrace roztoků byly 10 mg/l ibuprofenu a 5 mg/l ibuprofenu, 5 mg/l 2-hydroxyibuprofenu a 5 mg/l ketoprofenu. Do pěti baněk s rostlinami bylo přidáno 100 ml roztoku ibuprofenu o koncentraci 5 mg/l, do dalších pěti bylo přidáno 100 ml roztoku ketoprofenu o stejné koncentraci a do třetí pětice bylo rovněž přidáno 100 ml roztoku 2-hydroxyibuprofenu. Do sedmi baněk bylo přidáno 100 ml roztoku ibuprofenu o koncentraci 10 mg/l. Po přidání roztoků léčiv bylo okamžitě z kultivačního media odebráno po 1 ml pro stanovení výchozí koncentrace. Zároveň byly založeny slepé pokusy extrakcí léčiv v nekontaminované vodě jako srovnávací standardy pro biochemické analýzy.

Další odběry byly prováděny stejným způsobem u každé baňky jednou denně. Vynechány byly pouze baňky, v nichž se nenacházely roztoky léčiv (slepé pokusy). Celkem bylo pro potřeby experimentu provedeno 7 odběrů po dobu 9 dnů.

Po odebrání posledního vzorku byly rostliny vyjmuty z baněk. Kořeny rostlin byly odděleny od nadzemních částí. Od vzorků rostlinné hmoty byla oddělena semena a deformované části. Rostlinná hmota byla zvážena. Vzorky byly následně zmraženy v tekutém dusíku a ponechány v mrazicím boxu při – 80 °C stupních.

5.2.2. Kultivace za účelem stanovení extrahovatelných reziduí

Postup byl analogický postupu popsanému v sekci 5.2.1. Do baněk po šesti rostlinách byly přidány roztoky o zvolených koncentracích daných léčiv a o objemu 100 ml. Nebyly ale odebírány vzorky roztoku. Rostliny byly ponechány sedm

dní růst. Po sedmi dnech byly rostliny vyjmuty z baněk. Byly odděleny kořeny a nadzemní části rostlin. Získané rostlinné vzorky byly zváženy a vloženy do mrazicího boxu a mraženy při teplotě –20 °C.

Další den byly od vzorků kořenů rostlin odstraněny zbytky semen. Každý vzorek rostlinného materiálu byl rozetřen v třecí misce s malým přídavkem mořského písku. Rostlina byla během procesu domražována přiléváním tekutého dusíku dle potřeby. Do třecí misky bylo následně přidáno 20 ml ethyl-acetátu. Směs byla přelita do Erlenemyerovy baňky a po dobu 5 minut ultrazvukována. Suspenze byla přefiltrována přes smotek vaty za účelem odstranění mořského písku a zbytků rostlinné tkáně. Do filtrátu bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného za účelem odstranění přítomné vody a roztoky byly ponechány se sušidlem přes noc. Druhý den byly roztoky přefiltrovány přes smotek vaty do předem zvážených baněk pro odpařování na vakuové odparce. Roztoky byly odpařeny za vakua do sucha. Hmotnost odparků byla určena diferenční metodou na analytických vahách.

K odparkům byl přidán 1 ml methanolu. Methanolové roztoky byly následně ředěny v poměru jedna ku deseti pomocí příslušné mobilní fáze, čímž byly získány vzorky pro analýzu pomocí HPLC/UV.

5.3. Analýza vzorků pomocí HPLC/UV

Získané vzorky byly po rozmražení centrifugovány po dobu 10 minut pomocí stolní centrifugy při 1400 otáčkách za minutu. Získaný supernatant byl analyzován pomocí HPLC. Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno pomocí software *Clarity*.

Pro stanovení koncentrace ibuprofenu byla použita mobilní fáze o složení 4:1 methanol:voda (v/v). Směs byla okyselena přidáním 250 µl kyseliny fosforečné na 1000 ml směsi. Měření bylo provedeno při vlnové délce 230 nm.

Pro stanovení koncentrace 2-hydroxyibuprofenu byla použita mobilní fáze o složení 2:3 acetonitril:voda (v/v). Směs byla okyselena přidáním 200 µl kyseliny fosforečné na 1000 ml směsi. Měření bylo provedeno při vlnové délce 220 nm.

Pro stanovení koncentrace ketoprofenu byla použita mobilní fáze o složení 3:2 acetonitril:voda (v/v). Směs byla okyselena přidáním 200 µl kyseliny fosforečné na 1000 ml směsi. Měření bylo provedeno při vlnové délce 258 nm.

5.4. Biochemická analýza účinků xenobiotik

5.4.1. Stanovení peroxidace lipidů

Rostlinný materiál byl homogenizován ve třecí misce s kapalným dusíkem. Ke vzorku bylo přidáno trojnásobné množství 0,1% roztoku kyseliny trichloroctové (TCA). Směs byla převedena do mikrozkumavky a centrifugována při frekvenci 12000 otáček za minutu po dobu 15 minut. Do nové zkumavky bylo pipetováno 50 µl supernatantu. Do zkumavky bylo rovněž pipetováno 100 µl 20% roztoku TCA a 100 µl 0,67% TBA. Směs byla důkladně promíchána. Pomocí suché lázně byl roztok v mikrozkumavce ohříván při teplotě 95 °C po dobu 15 minut. Následně byl roztok rychle zchlazen pomocí ledové lázně, ve které byl ponechán po dobu 10 minut. Roztok byl centrifugován při frekvenci 10000 otáček za minutu po dobu 5 minut. Následně byla změřena absorbance při vlnových délkách 532 a 600 nm. Za účelem kalibrace byla změřena absorbance připravených roztoků malondialdehydu (MDA) v rozsahu koncentrací 1 – 1000 µM. Postup byl upraven podle [48].

5.4.2. Šikimátdehydrogenasa

Rostlinný materiál byl homogenizován ve třecí misce s tekutým dusíkem. K získanému rostlinnému materiálu bylo přidáno PVP ve množství na špičku lžičky. Následně bylo do misky pipetováno čtyřnásobné množství extrakčního pufru složeného z 100mM Tris-HCl pufru o pH 7,8 a zároveň 1mM DTT, 1mM EDTA a 10mM askorbátu sodného. Následně byla směs centrifugována při frekvenci 15000 × g, teplotě 4 °C a po dobu 15 minut. Supernatant byl odpipetován do nové zkumavky.

Do jamek na mikrotitrační destičku bylo pipetováno 6 µl 100mM šikimátu, 4 µl 10mM NADP, 100 µl destilované vody, 10 µl získaného supernatantu a 80 µl 250mM AMP-NaOH o pH 9,0. Měření bylo připraveno v triplikátu. Následně byla kontinuálně měřena absorbance při 340 nm po dobu 5 minut s intervalem měření 15 s. Postup byl upraven podle [49].

5.4.3. Celkové peroxidasy

Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno 20 µl extraktu získaného postupem popsaným v sekci 5.4.2 a k němu bylo přidáno 5 µl 49mM peroxidu vodíku, 20 µl roztoku DAB připraveného rozpuštěním 10 mg ve 2,5 ml 96% ethanolu a 155 µl 50mM fosfátového pufru o pH 7,0. Měření bylo připraveno v triplikátu. Následně byla kontinuálně měřena absorbance při 430 nm po dobu 5 minut s intervalem měření 15 s. Postup byl upraven podle [50].

5.4.4. Membránově vázané peroxidasy

K sedimentu získanému v kroku 5.4.2 byl přidán roztok 1M NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 10mM askorbátu sodného a 100mM Tris-HCl pufru o pH 7,8 o objemu rovném extrakčnímu pufru, který byl k rostlinnému materiálu přidán v předešlém kroku před centrifugací. Následně byla provedena stejná příprava pro měření absorbance jako v sekci 5.4.3. Rovněž byla provedena v triplikátech a rovněž byla následně kontinuálně měřena absorbance při vlnové délce 430 nm po dobu 5 minut s intervalem měření 15 s [50].

5.4.5. Stanovení množství proteinů dle Bradforda

Supernatant získaný v sekci 5.4.2 byl v objemu 20 µl pipetován do jamek na mikrotitrační destičku. K roztoku do jamek bylo pipetováno i 200 µl Bradfordova činidla. Směs byla ponechána inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a následně byla měřena absorbance při vlnových délkách 595 a 450 nm. Za účelem kalibrace byla změřena absorbance připravených roztoků BSA v rozsahu koncentrací 0 – 0,4 mg/ml[51].

5.4.6. Nativní elektroforéza

5.4.6.1. Příprava gelů pro elektroforézu

Za účelem přípravy 10% polyakrylamidového separačního gelu pro nativní elektroforézu bylo smíšeno 7,9 ml destilované vody, 6,7 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5:1), 2 µl TEMED, 0,2 ml 10% (w/v) roztoku glycerolu a 5,0 ml 1,5M Tris–HCl pufru, pH 8,8. Po smíšení zmíněných roztoků bylo ke směsi pipetováno 200 µl 10% peroxodisíranu amonného, který zahájil vznik polymerů gelu. Získaná směs byla nalita mezi čtyři dvojice skel pro elektroforézu. Směsi byly převrstveny destilovanou vodou. Gely byly ponechány polymerizovat po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.

Po zpolymerování gelů byly převrstveny 4% zaostřovacím gelem. Za účelem jeho přípravy bylo smíšeno 1,22 ml destilované vody, 0,26 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5:1), 0,5 µl TEMED, 0,02 ml 10% (w/v) roztoku glycerolu a 0,5 ml 0,5M Tris–HCl pufru o pH 6,8. Po smíšení zmíněných roztoků bylo ke směsi rovněž přidáno 20 µl 10% peroxodisíranu amonného. Za účelem vytvoření jamek pro pipetování roztoků vzorků byla vložena mezi elektroforetická skla plastová šablona.

5.4.6.2. Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy

Ke 200 µl supernatantu získaného postupem popsaným v sekci 5.4.2 bylo do mikrozkumavky přidáno 40 mg sacharózy. Koncentrace sacharózy tedy činila 20% (w/v). Do jednotlivých jamek v zaostřovacím gelu bylo pipetováno takové množství připraveného extraktu, aby v každé jamce bylo stejné množství proteinů. Potřebné objemy vzorků pipetované do jamek byly odvozeny pomocí výsledků získaných stanovením dle Bradforda popsaného v sekci 5.4.5.

Připravené gely mezi skly byly vloženy do elektroforetické vany. Vana byla naplněna elektrodovým pufrem, který byl připraven smíšením 10 ml 10% (w/v) glycerolu, 18,8 g glycinu, 3 g Tris a doplněn do celkového objemu, který činil jeden litr,

destilovanou vodou (pH 8,3). Do vrchního prostoru elektroforetické soustavy bylo k elektrodovému pufru před zahájením elektroforézy přidáno 100 µl 0,1% (w/v) bromfenolové modři.

Elektroforéza byla následně zahájena zapojením ke zdroji stejnosměrného proudu s počáteční hodnotou napětí 70 V. V momentě, kdy bromfenolová modř pronikla do separačního gelu, byla hodnota napětí zvýšena na 140 V. Elektroforéza byla ukončena, když bromfenolová modř doputovala k dolnímu okraji gelu. Gely byly vyjmuty ze skel a opláchnuty destilovanou vodou. Následně byly umístěny do konkrétních detekčních směsí odpovídajících stanovení konkrétního enzymu.

5.4.6.3. Detekce aktivity celkových peroxidas

Za účelem zobrazení izoforem peroxidas byla připravena detekční směs obsahující 0,01 g DAB, který byl rozpuštěn ve 2,5 ml 96% ethanolu, 100 µL 30% peroxidu vodíku a 7 ml 100 mM fosfátového pufru o pH 7,0. Směs byla doplněna ještě 0,4 ml destilované vody za účelem dosažení celkového objemu 10 ml. Roztok byl následně v plastové zkumavce vložen do ultrazvukové lázně na dobu 5 minut. Gel byl inkubován v tomto roztoku do druhého dne při laboratorní teplotě a poté byl opláchnut destilovanou vodou[50].

5.4.6.4. Detekce aktivity glutathion-S-transferas

Za účelem zobrazení izoforem glutathion-S-transferas byl gel nejprve inkubován v roztoku o složení 4,5mM glutathionu, 1mM CDNB, 1mM NBT a 100mM fosfátového pufru o pH 6,5. Celkový objem roztoku činil 10 ml. Gel byl inkubován po dobu 10 minut při teplotě 37 °C. Následně byl gel opláchnut destilovanou vodou. Po omytí byl umístěn do druhého roztoku o složení 3mM PMS a 100mM Tris–HCl o pH 9,6. V roztoku byl gel ponechán při laboratorní teplotě do druhého dne. Následně byl gel několikrát promyt vodou[52].

5.4.6.5. Detekce aktivity NADPHoxidasy

Za účelem zobrazení izoforem NADPHoxidas byl gel nejprve inkubován v roztoku o složení 0,2mM NBT, 0,1mM chloridu hořečnatého, 1mM chloridu vápenatého a 50mM Tris–HCl pufru o pH 7,5. Celkový objem roztoku činil 10 ml. V připraveném roztoku byl gel inkubován ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Následně bylo k roztoku přidáno NADPH, aby jeho celková koncentrace v roztoku činila 0,2mM. Bylo pozorováno modré zbarvení oblastí výskytu izoforem v gelu. Reakce byla zastavena ponořením gelu do destilované vody[53].

6. Výsledky

6.1. Kalibrace

Za účelem kalibrace byly připraveny roztoky ibuprofenu v 96% methanolu o koncentracích 1,3,5,7,10 a 15 mg/l. Pomocí programu *Clarity* byla získána lineární závislost plochy píku na koncentraci látky v roztoku. Interval spolehlivosti činil 0,9994737. Mez detekce činila 0,05 mg/l a mez stanovitelnosti činila 0,15 mg/l.

Za účelem kalibrace byly připraveny roztoky 2-hydroxyibuprofenu v 96% methanolu o koncentracích 1,3,5,7,10 a 15 mg/l. Pomocí programu *Clarity* byla získána lineární závislost plochy píku na koncentraci látky v roztoku. Interval spolehlivosti činil 0,9994597. Mez detekce činila 0,04 mg/l a mez stanovitelnosti činila 0,12 mg/l.

Za účelem kalibrace byly připraveny roztoky ketoprofenu v 96% methanolu o koncentracích 1,3,5,7,10 a 15 mg/l. Pomocí programu *Clarity* byla získána lineární závislost plochy píku na koncentraci látky v roztoku. Interval spolehlivosti činil 0,9990562. Mez detekce činila 0,02 mg/l a mez stanovitelnosti činila 0,05 mg/l.

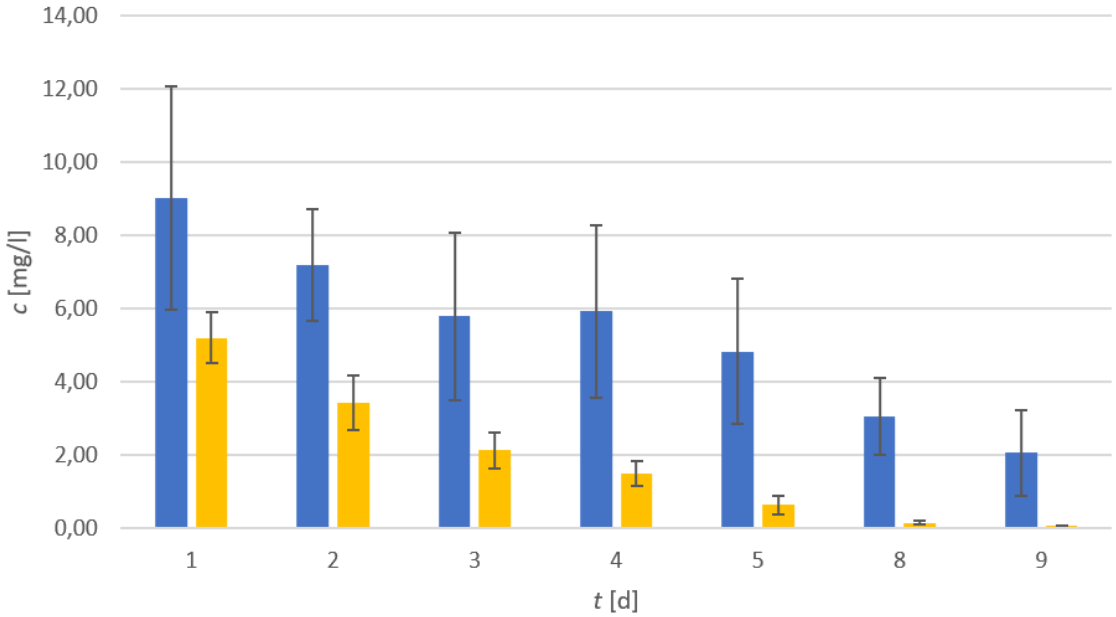
6.2. Fytoremediace

Tabulka 1: Hodnoty koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi v přítomnosti rostliny v baňkách označených 1 až 5 v závislosti na uplynulém čase od přidání léčiva dané v mg/l s uvedenými hodnotami jejich průměru, mediánu a směrodatné odchylky (provedení s cílenou počáteční koncentrací 5 mg/l)

Den/číslo experimentu	1	2	3	4	5	Průměr	Smodch.	Medián
1	5,91	4,15	4,58	5,58	5,73	5,19	0,70	5,58
2	4,02	2,51	2,51	4,14	3,91	3,42	0,74	3,91
3	2,35	1,44	1,97	2,91	1,98	2,13	0,49	1,98
4	1,42	1,58	1,32	2,10	1,05	1,50	0,35	1,42
5	0,89	0,41	0,35	0,98	0,52	0,63	0,25	0,52
8	0,22	0,15	0,11	0,17	0,07	0,14	0,05	0,15
9	0,07	0,04	0,07	0,04	0,05	0,05	0,01	0,05

Tabulka 2: Hodnoty koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi v přítomnosti rostliny v baňkách označených 1 až 7 v závislosti na uplynulém čase od přidání léčiva dané v mg/l s uvedenými hodnotami jejich průměru, mediánu a směrodatné odchylky (provedení s cílenou počáteční koncentrací 10 mg/l)

Den/číslo experimentu	1	2	3	4	5	6	7	Průměr	Smodch.	Medián
1	2,76	9,04	9,27	9,76	12,98	11,80	7,59	9,03	3,05	9,27
2			8,77	4,29	7,51	7,51	7,90	7,19	1,52	7,51
3			6,42	2,79	3,74	9,24	6,71	5,78	2,30	6,42
4			5,96	1,96	5,07	8,32	8,32	5,93	2,36	5,96
5			4,67	1,48	4,28	6,67	7,02	4,83	1,99	4,67
8			2,79	1,60	2,40	4,45	4,04	3,06	1,05	2,79
9	2,06	0,77	1,52	0,75	1,84	3,81	3,73	2,07	1,17	1,84



Graf 1: Pokles koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi v přítomnosti rostliny dané v miligramech na litr v závislosti na čase daném ve dnech (experiment 10 mg/l znázorněn modře, 5 mg/l žlutě).

Tabulky 1 a 2 uvádějí hodnoty získané pomocí fytoextrakce. Graf 1 znázorňuje závislost průměrných hodnot koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi na době uplynulé od přidání léčiva.

Během pokusu s nižší vstupní koncentrací došlo ke snížení koncentrace xenobiotika v průměru o 5,14 mg/l, což odpovídá 99 % původní dávky. Při celkové čerstvé hmotnosti rostlin činící 16,16 g a objemu vodné fáze v každé baňce 100 ml odpovídá účinnost fytoextrakce tedy hodnotě 0,16 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny.

Během pokusu s vyšší původní koncentrací došlo ke snížení koncentrace xenobiotika v průměru o 6,96 mg/l, což odpovídá 77 % původní dávky. Při celkové čerstvé hmotnosti rostlin činící 28,23 g a objemu vodné fáze v každé baňce 100 ml

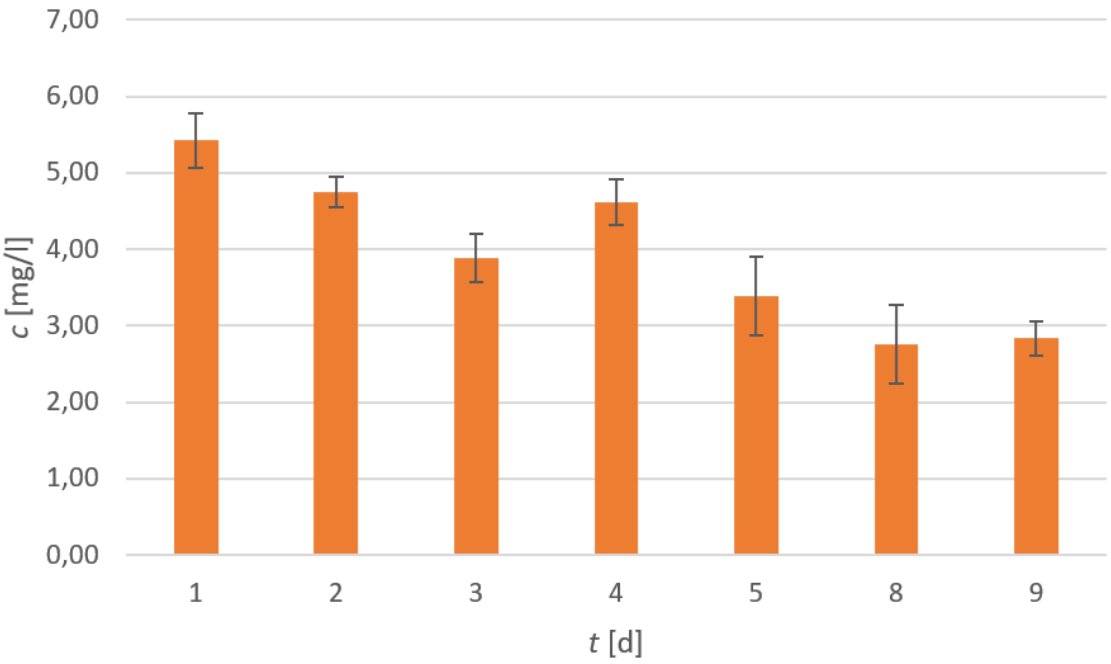
odpovídá účinnost fytoextrakce tedy hodnotě 0,17 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny.

Nižší hodnoty snížení koncentrace ibuprofenu při vyšší původní koncentraci mohou naznačovat dosažení maximální transportní či adsorpční kapacity rostliny.

Experimenty zahrnující fytoextrakci 2-hydroxyibuprofenu vedly rovněž k významnému poklesu koncentrace studované látky v kultivačním mediu a jsou znázorněny v tabulce 3 a pro větší názornost i v grafu 2.

Tabulka 3: Hodnoty koncentrace 2-hydroxyibuprofenu ve vodné fázi v přítomnosti rostliny v baňkách označených čísly 1 až 5 v závislosti na uplynulém čase od přidání léčiva dané v mg/l s uvedenými hodnotami jejich průměru, mediánu a směrodatné odchylky

Den/číslo experimentu	1	2	3	4	5	Průměr	Smodch.	Medián
1	5,93	5,15	5,71	5,37	4,96	5,43	0,36	5,37
2	4,62	4,53	4,80	4,71	5,09	4,75	0,19	4,71
3	4,24	3,94	3,50	4,22	3,53	3,89	0,32	3,94
4	4,92	4,92	4,11	4,62	4,51	4,62	0,30	4,62
5	3,30	3,23	2,60	4,20	3,60	3,39	0,52	3,30
8	2,67	3,07	2,74	3,44	1,88	2,76	0,52	2,74
9	2,61	2,81	2,60	3,01	3,16	2,84	0,22	2,81



Graf 2: Pokles koncentrace 2-hydroxyibuprofenu ve vodné fázi v přítomnosti rostliny dané v miligramech na litr v závislosti na čase daném ve dnech

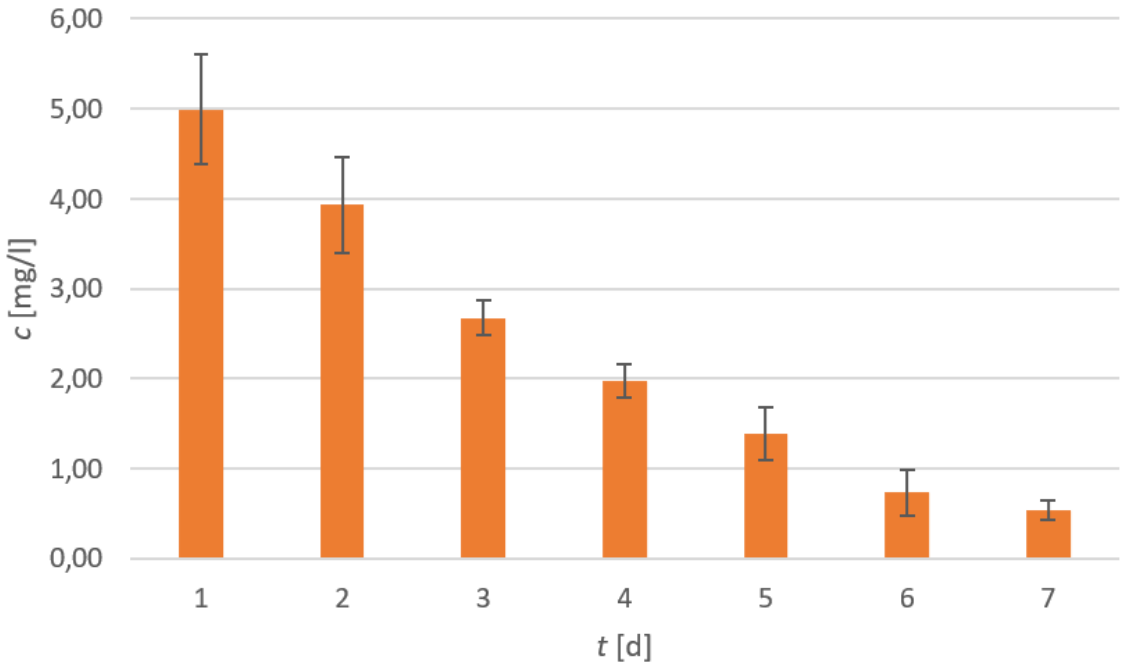
Po devíti dnech fytoextrakce došlo ke snížení původní koncentrace v průměru o 2,59 mg/l, což odpovídá 47 % původní dávky. Při celkové čerstvé hmotnosti rostlin činící 18,23 g a objemu vodné fáze v každé baňce 100 ml odpovídá účinnost fytoextrakce tedy hodnotě 0,07 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny.

V grafu 2 je patrno, že během čtvrtého dne došlo k navýšení koncentrace xenobiotika v roztoku. Navýšení koncentrace bylo pravděpodobně způsobeno odumřením části rostlin, především kořenů, ze kterých mohlo být nashromážděné xenobiotikum uvolněno zpět do roztoku. Nižší účinnost fytoextrakce oproti hodnotám naměřeným pro ibuprofen pravděpodobně souvisí s polárnějším charakterem metabolitu, který zamezuje prostupování membránami a usnadňuje rozpustnost ve vodě.

Tabulka 4 uvádí hodnoty získané v průběhu fytoextrakce ketoprofenu. Graf 3 znázorňuje závislost průměrných hodnot studovaného sloučeniny ve vodné fázi na době uplynulé od přidání léčiva.

Tabulka 4: Hodnoty koncentrace ketoprofenu ve vodné fázi v přítomnosti rostliny v baňkách označených čísly 1 až 5 v závislosti na uplynulém čase od přidání léčiva dané v mg/l s uvedenými hodnotami jejich průměru, mediánu a směrodatné odchylky

Den/číslo experimentu	1	2	3	4	5	Průměr	Smodch.	Medián
1	4,28	4,40	5,35	5,00	5,94	4,99	0,61	5,00
2	2,92	3,95	4,18	4,20	4,42	3,93	0,53	4,18
3	2,41	2,49	2,75	2,87	2,86	2,68	0,19	2,75
4	1,83	1,76	2,11	2,25	1,93	1,97	0,18	1,93
5	1,93	1,41	1,30	1,06	1,25	1,39	0,29	1,30
8	1,25	0,58	0,64	0,54	0,66	0,73	0,26	0,64
9	0,74	0,41	0,52	0,55	0,47	0,54	0,11	0,52



Graf 3: Pokles koncentrace ketoprofenu ve vodné fázi v přítomnosti rostliny dané v miligramech na litr v závislosti na čase daném ve dnech

Po devíti dnech fytoextrakce došlo ke snížení původní koncentrace v průměru o 4,45 mg/l, což odpovídá 89 % původní dávky. Při celkové čerstvé hmotnosti rostlin činící 15,84 g a objemu vodné fáze v každé baňce 100 ml odpovídá účinnost fytoextrakce tedy hodnotě 0,14 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny.

6.3. Analýza kultivačního média při fytoextrakci ibuprofenu

Pomocí postupu pro stanovení koncentrace 2-hydroxyibuprofenu popsaného v sekci 5.3 byla stanovena koncentrace 2-hydroxyibuprofenu uvolněného rostlinou do média během fytoextrakce ibuprofenu. Tabulka 5 popisuje jeho naměřené koncentrace ve vodné fázi, v níž rostly rostliny po dobu 9 dnů. Jedná se o vzorky získané posledním odběrem během dvou pokusů fytoremediace ibuprofenu. První sloupec označuje číslo experimentu, druhý označuje výsledky změřené pro roztoky s nižší počáteční koncentrací a třetí sloupec označuje výsledky změřené pro roztoky s vyšší počáteční koncentrací. Průměrná hodnota dat ve druhém sloupci činí 0,81 mg/l. Průměrná hodnota dat ve třetím sloupci činí 1,35 mg/l.

Tabulka 5: Hodnoty koncentrace 2-hydroxyibuprofenu uvolněného do vodné fáze rostlinou rostoucí v přítomnosti ibuprofenu dané v mg/l

Baňka	c_5 [mg/l]	c_{10} [mg/l]
1	0,94	1,19
2	1,01	0,94
3	0,92	0,98
4	0,52	2,41
5	0,66	1,22

V souvislosti s naměřenými hodnotami poklesu množství ibuprofenu ve fytoextrakčním experimentu za 9 dnů popsané v sekci 6.2. odpovídalo látkové množství uvolněného 2-hydroxyibuprofenu v případě experimentu s nižší původní koncentrací léčiva 15 % látkového množství ibuprofenu odstraněného z roztoku rostlinou. V případě experimentu s vyšší původní koncentrací léčiva odpovídala hodnota 18 %.

6.4. Stanovení extrahovatelných reziduí

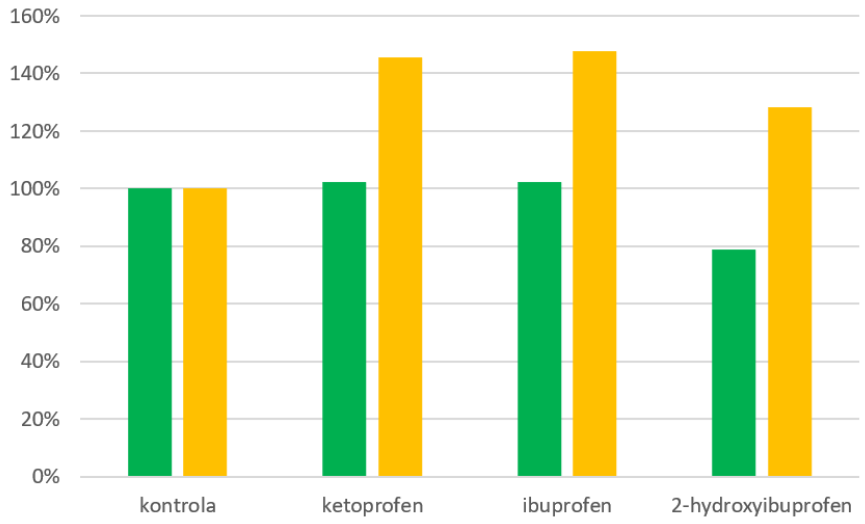
Tabulka 6: Koncentrace léčiv v čerstvé hmotnosti jednotlivých částí rostliny

	m_{listy} [mg/g]	$m_{kořeny}$ [mg/g]
ibuprofen$_5$	0,011	0,005
ibuprofen$_{10}$	0,013	0,004
ketoprofen	0,011	0,001

Tabulka 6 byla sestavena z dat získaných pomocí postupu popsaného v sekci 5.2.2. Data jsou udána v mg léčiva na 1,00 g čerstvé hmotnosti odpovídající části rostliny. Výsledky jsou pouze orientační, neboť naměřené hodnoty byly jen těsně nad limitem kvantifikovatelnosti a vyhodnocení bylo komplikováno složitostí analyzovaného vzorku. Hodnoty odpovídající vzorkům získaným z rostlin kultivovaných na mediu s 2-hydroxyibuprofenem nejsou uvedeny, neboť se nacházely již pod prahem kvantifikovatelnosti a přiřazení odpovídajících píků by bylo již sporné.

6.5. Biochemická analýza účinků xenobiotik

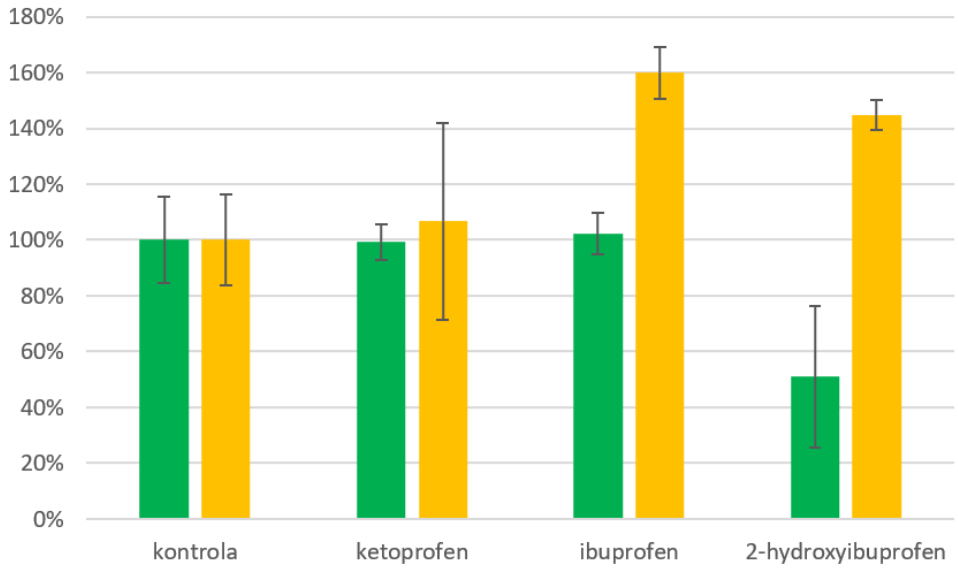
6.5.1. Peroxidace lipidů



Graf 4: Výsledky stanovení peroxidace lipidů s hodnotami odpovídajícími oxidačnímu stresu v listech označenými zeleně a hodnotami odpovídajícími peroxidaci v kořenech označenými oranžově

Graf 4 ilustruje výsledky analýzy oxidačního stresu lipidů stanovených pomocí metody popsané v sekci 5.4.1. Hodnoty odpovídající kontrole byly označeny 100 %. V případě listů nedošlo k výrazným změnám oproti kontrole kromě vzorku odpovídajícímu rostlině rostoucí v přítomnosti 2-hydroxyibuprofenu. V něm klesla hodnota na hodnotu 72 %. Nárůst oxidačního stresu ve vzorcích kořenů byl zaznamenán u všech léčiv. Nejvyšší hodnotě odpovídal vliv ibuprofenu, jehož hodnota odpovídala 148 %.

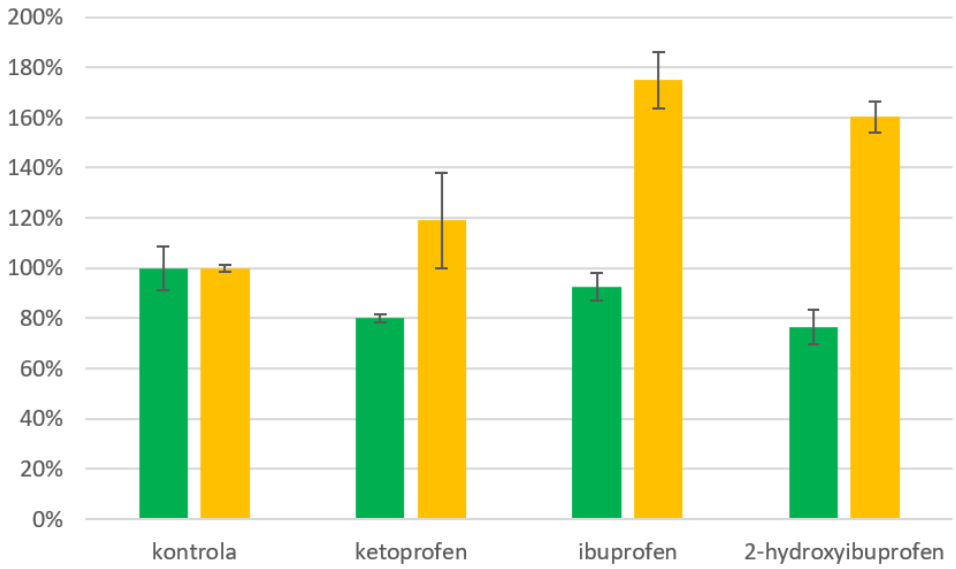
6.5.2. Aktivita šikimátdehydrogenasy



Graf 5: Výsledky stanovení enzymové aktivity šikimátdehydrogenasy s hodnotami odpovídajícími enzymovým aktivitám v listech označenými zeleně a hodnotami odpovídajícími enzymovým aktivitám v kořenech označenými oranžově

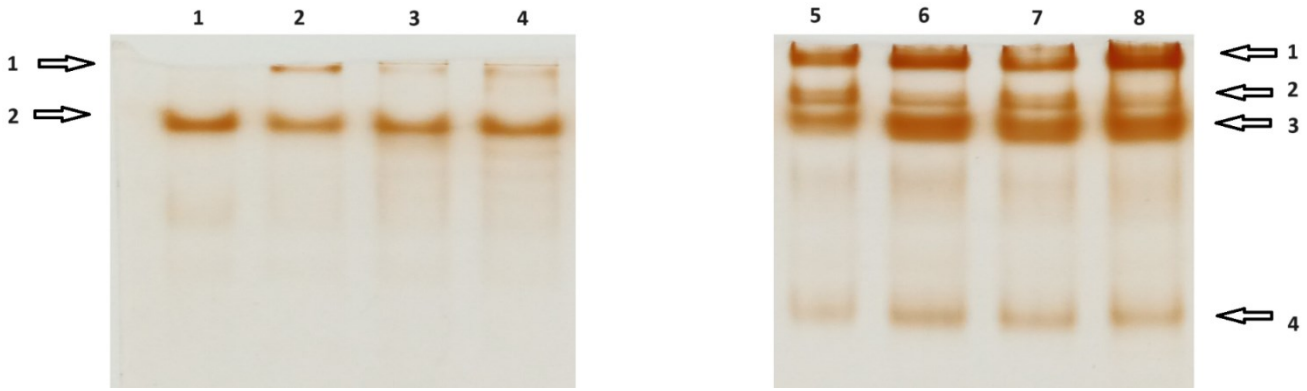
Graf 5 ilustruje výsledky analýzy enzymové aktivity šikimátdehydrogenasy stanovené pomocí metody popsané v sekci 5.4.2. Hodnoty odpovídající kontrole byly označeny 100 %. V případě listů nedošlo k výrazným změnám oproti kontrole kromě vzorku, odpovídajícímu rostlině rostoucí v přítomnosti 2-hydroxyibuprofenu. V něm klesla hodnota na hodnotu 51 %. Nárůst oxidačního stresu ve vzorcích kořenů byl zaznamenán u všech léčiv. Účinek ketoprofenu vrostl oproti kontrole nepatrně. Nejvyšší hodnotě odpovídal vliv ibuprofenu, jehož hodnota odpovídala 160 %.

6.5.3. Aktivita celkových peroxidas



Graf 6: Výsledky stanovení enzymové aktivity celkových peroxidas s hodnotami odpovídajícími enzymovým aktivitám v listech označenými zeleně a hodnotami odpovídajícími enzymovým aktivitám v kořenech označenými oranžově

Graf 6 ilustruje výsledky analýzy enzymové aktivity celkových peroxidas stanovené pomocí metody popsané v sekci 5.4.3. Hodnoty odpovídající kontrole byly označeny 100 %. V případě listů došlo ke snížení aktivity oproti kontrole. Nejnižší hodnotu nabývá výsledek odpovídající vzorku rostliny rostoucí v přítomnosti 2-hydroxyibuprofenu, ta nabývá hodnoty 77 %. Nárůst aktivity ve vzorcích kořenů byl zaznamenán u všech léčiv. Nejvyšší hodnotě odpovídal vliv ibuprofenu, jehož hodnota odpovídala 175 %.

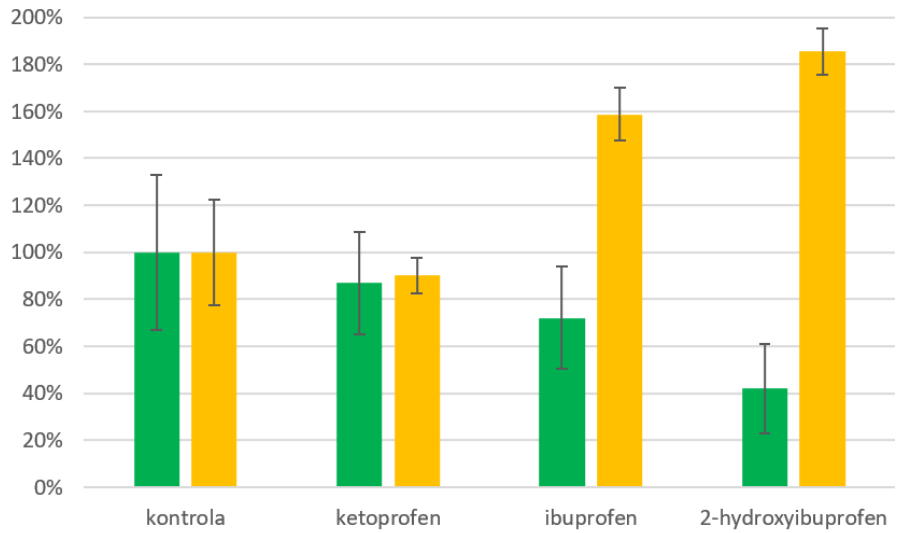


Obrázek 4: Výsledek detekce izoforem peroxidas po nativní elektroforetické separaci za nativních podmínek, dráhy 1-4 odpovídají vzorkům listů v pořadí kontrola, ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen a ketoprofen, dráhy 5-8 odpovídají vzorkům kořenů ve stejném pořadí

Na obrázku 4 je fotografie gelu po dokončení elektroforézy popsané v sekci 5.4.6.3. V případě vzorků listů byly zaznamenány většinou dvě izoformy kromě kontroly, u které byla zaznamenána pouze jedna. Intenzita izoforem, jejichž retenční faktor byl shodný s izoformou rozpoznanou v případě kontroly, byla u všech zbylých vzorků listů nižší.

V případě vzorků kořenů bylo zaznamenáno vícero izoforem. Jejich počet není jasně stanovitelný. U vzorků kořenů byla zaznamenána výrazně vyšší aktivita oproti aktivitám vzorků listů. Intenzita izoformy, která byla rozpoznána v pořadí jako druhá, byla ve vzorcích ovlivněných xenobiotiky nižší než v případě kontroly, ale u všech zbylých izoforem byl trend výrazně opačný.

6.5.4. Aktivita membránově vázaných peroxidas

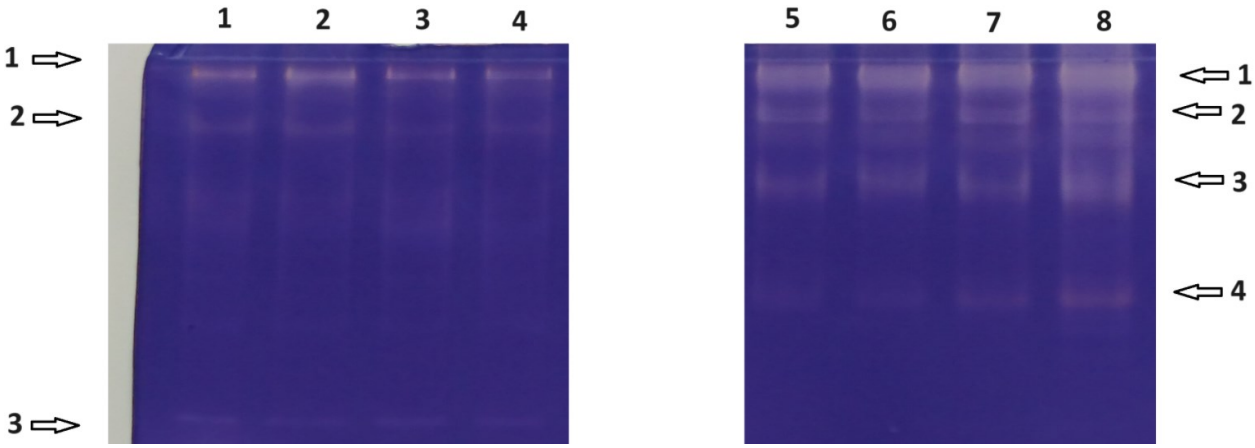


Graf 7: Výsledky stanovení enzymové aktivity membránově vázaných peroxidas s hodnotami odpovídajícími enzymovým aktivitám v listech označenými zeleně a hodnotami odpovídajícími enzymovým aktivitám v kořenech označenými oranžově

Graf 7 ilustruje výsledky analýzy enzymové aktivity membránově vázaných peroxidas stanovené pomocí metody popsané v sekci 5.4.4. Hodnoty odpovídající kontrole byly označeny 100 %. V případě listů došlo ke snížení aktivity oproti kontrole. Nejnižší hodnoty nabývá výsledek odpovídající vzorku rostliny rostoucí v přítomnosti 2-hydroxyibuprofenu, ta nabývá hodnoty 42 %. Nárůst aktivity ve vzorcích

kořenů byl zaznamenán u všech léčiv. Nejvyšší hodnotě odpovídal vliv 2-hydroxyibuprofenu, jehož hodnota odpovídala 185 %.

6.5.5. Detekce aktivity glutathion-S-transferas

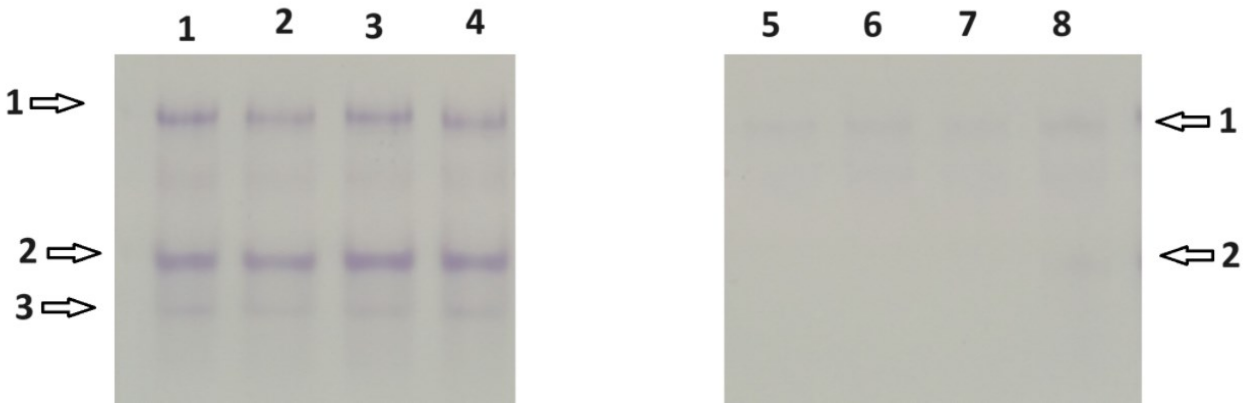


Obrázek 5: Výsledek detekce izoforem GST po nativní elektroforetické separaci za nativních podmínek, dráhy 1-4 odpovídají vzorkům listů v pořadí kontrola, ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen a ketoprofen, dráhy 5-8 odpovídají vzorkům kořenů ve stejném pořadí

Na obrázku 5 je fotografie gelu po dokončení elektroforézy popsané v sekci 5.4.6.4. V případě vzorků listů byly zaznamenány tři izoformy. Nejvyšší intenzitu měla ve všech čtyřech případech první izoforma. Nejvyšší intenzitu měla první izoforma u ibuprofenu v dráze číslo 2, která byla lehce vyšší oproti kontrole. U zbylých dvou xenobiotik byla intenzita oproti kontrole v případě první izoformy nižší.

V případě vzorků kořenů bylo zaznamenáno vícero izoforem. Jejich počet není jasně stanovitelný. U vzorků kořenů byla zaznamenána výrazně vyšší aktivita oproti aktivitám vzorků listů. Oproti kontrole se účinky xenobiotik příliš nelišily. V případech 2-hydroxyibuprofenu a ketoprofenu v drahách 7 a 8 je oproti kontrole možno rozeznat navíc jednu izoformu s nejvyšší mobilitou (číslo 4 na obrázku 5). Intenzita zmíněných izoforem se nachází těsně nad prahem detekce. Je zjevné, že v případě ketoprofenu v dráze 8 je v porovnání s ostatními xenobiotiky přítomno vícero izoforem, které ale leží pod mezí detekce.

6.5.6. Detekce aktivity NADPHoxidasy

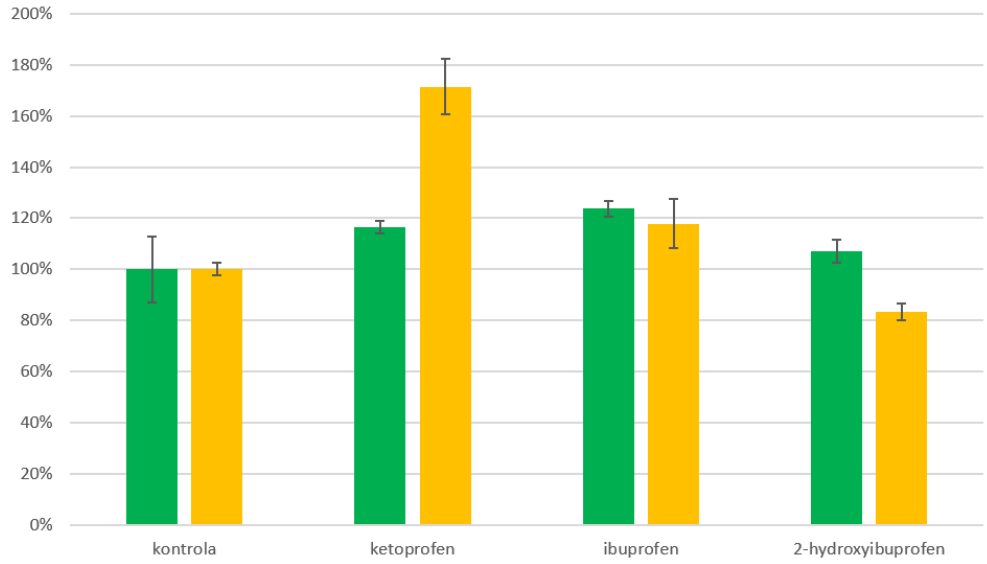


Obrázek 6: Výsledek detekce izoforem NADPHoxidasy po gelové elektroforetické separaci za nativních podmínek, dráhy 1-4 odpovídají vzorkům listů v pořadí kontrola, ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen a ketoprofen, dráhy 5-8 odpovídají vzorkům kořenů ve stejném pořadí

Na obrázku 6 je fotografie gelu po dokončení elektroforézy popsané v sekci 5.4.6.5. V případě vzorků listů byly zaznamenány tři izoformy. Nejvyšší intenzitu měla ve všech čtyřech případech prostřední, druhá izoforma. Nejvyšší rozdíl v její intenzitě v porovnání s kontrolou byl naměřen u vzorku odpovídajícímu účinkům 2-hydroxyibuprofenu v dráze číslo 3.

V případě vzorků kořenů byla zaznamenána ve většině případů jen jedna izoforma o nízké intenzitě. Výjimkou byl vzorek odpovídající účinkům ketoprofenu v dráze číslo 8. U něj byla zaznamenána i druhá izoforma o velmi nízké intenzitě.

6.5.7. Stanovení množství proteinů dle Bradforda



Graf 8: Výsledky stanovení množství proteinů dle Bradforda s hodnotami odpovídajícími množství proteinů v listech označenými zeleně a hodnotami odpovídajícími množství proteinů v kořenech označenými oranžově

Graf 8 ilustruje výsledky stanovení množství proteinů pomocí metody popsané v sekci 5.4.3. Hodnoty odpovídající kontrole byly označeny 100 %. V případě listů došlo k mírnému navýšení oproti kontrole. Nejvyšší hodnoty nabývá výsledek odpovídající vzorku rostliny rostoucí v přítomnosti ibuprofenu, ta nabývá hodnoty 124 %. Nárůst aktivity ve vzorcích kořenů byl zaznamenán u ketoprofenu a ibuprofenu. Nejvyšší hodnotě odpovídal vliv ketoprofenu, jehož hodnota odpovídala 171 %. U 2-hydroxyibuprofenu byl zaznamenán pokles na hodnotu 83 %.

7. Diskuse

Během pokusu fytoextrakce ibuprofenu pomocí kukuřice seté (*Zea mays*) s původní cílenou koncentrací ibuprofenu o hodnotě 5 mg/l došlo ke snížení koncentrace xenobiotika po devíti dnech fytoextrakce v průměru o 5,14 mg/l, což odpovídá 99 % původní dávky. Účinnost fytoextrakce tedy odpovídá hodnotě 0,16 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny. Během pokusu s vyšší původní koncentrací, tedy s cílenou koncentrací 10 mg/l, došlo ke snížení koncentrace xenobiotika v průměru o 6,96 mg/l, což odpovídá 77 % původní dávky. Účinnost fytoextrakce odpovídá hodnotě 0,17 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny. Nižší hodnoty snížení koncentrace ibuprofenu při vyšší původní koncentraci mohou naznačovat dosažení maximální extrakční kapacity rostliny ať již ve smyslu aktivního záchytu či adsorpční kapacity kořenů.

Během fytoextrakce 2-hydroxyibuprofenu pomocí kukuřice seté (*Zea mays*) s původní cílenou koncentrací 2-hydroxyibuprofenu o hodnotě 5 mg/l došlo ke snížení koncentrace xenobiotika po devíti dnech fytoextrakce v průměru o 2,59 mg/l, což odpovídá 47 % původní dávky. Účinnost fytoextrakce odpovídá hodnotě 0,07 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny.

Během pokusu fytoextrakce ketoprofenu pomocí kukuřice seté (*Zea mays*) s původní cílenou koncentrací ketoprofenu o hodnotě 5 mg/l došlo ke snížení koncentrace xenobiotika po devíti dnech fytoextrakce v průměru o 4,45 mg/l, což odpovídá 89 % původní dávky. Účinnost fytoextrakce odpovídá hodnotě 0,14 mg léčiva na 1,00 gram čerstvé hmotnosti rostliny.

Nižší účinnost fytoextrakce 2-hydroxyibuprofenu oproti hodnotám naměřeným pro ibuprofen a ketoprofen pravděpodobně souvisí s polárnějším charakterem metabolitu, který ztěžuje prostup membránami a zvyšuje rozpustnost ve vodě.

Byla stanovena koncentrace 2-hydroxyibuprofenu uvolněného do roztoku ibuprofenu o koncentraci 5 mg/l během jeho fytoextrakce pomocí kukuřice seté (*Zea mays*). Po devíti dnech fytoextrakce došlo k navýšení koncentrace metabolitu v průměru na hodnotu 0,81 mg/l. V případě výchozí koncentrace ibuprofenu rovné hodnotě 10 mg/l činila hodnota v 1,35 mg/l. Látkové množství uvolněného 2-hydroxyibuprofenu odpovídalo v případě experimentu s nižší původní koncentrací léčiva 15 % látkového množství ibuprofenu odstraněného z roztoku rostlinou. V případě s vyšší původní koncentrací léčiva odpovídala hodnota 18 %.

Výsledky odpovídají předpokladu, že polárnější metabolit bude více uvolňován do okolního vodního prostředí oproti kumulaci v buňkách rostliny. Z výsledků je rovněž zjevné, že se zvýšeným množstvím přijatého ibuprofenu rostlinou rovněž roste množství uvolněného 2-hydroxyibuprofenu do okolního prostředí.

Stanovení koncentrace extrahovatelných reziduí byla provedena pro ketoprofen, 2-hydroxyibuprofen a dvě výchozí koncentrace ibuprofenu. V případě nižší počáteční koncentrace ibuprofenu v roztoku byla naměřena hodnota koncentrace rezidua v rostlině daná v hmotnosti farmaka na čerstvou hmotnost rostlinné části 0,011 mg/g v listech a 0,005 mg/g v kořenech. Pro vyšší počáteční koncentraci ibuprofenu činila koncentrace v listech 0,013 mg/g a v kořenech 0,004 mg/g. V případě ketoprofenu činila koncentrace v listech 0,011 mg/g a v kořenech 0,001 mg/g. Hodnoty naměřené pro 2-hydroxyibuprofen se nacházely pod limitem detekce. Ve všech výsledcích je možné sledovat trend zvýšené koncentrace xenobiotika v listech oproti kořenům. Hodnoty odpovídající ibuprofenu a ketoprofenu jsou řádově shodné. Nízká koncentrace 2-hydroxyibuprofenu v rostlině může souviset s nízkou efektivitou jeho fytoextrakce z prostředí.

Byla sledována biochemická odpověď na přítomnost xenobiotik po dokončení fytoremediace za účelem stanovení míry oxidačního stresu působícího na rostlinu. Z výsledků je možné vypozorovat trend snižování enzymové aktivity související s antioxidačním systémem rostliny v případě vzorků listů. K největšímu snížení dochází u vzorků odpovídajících rostlinám rostoucím v prostředí 2-hydroxyibuprofenu. U kořenů je trend opačný a dochází k výraznému nárůstu. Trendu odpovídají výsledky peroxidace lipidů, enzymové aktivity šikimátdehydrogenasy a enzymové aktivity celkových i membránových peroxidas. K nejvyšší změně oproti kontrole došlo během stanovení enzymové aktivity membránově vázaných peroxidas vzorků rostlin rostoucích s 2-hydroxyibuprofenem v médiu. Aktivita se snížila oproti kontrole v případě listů na hodnotu 42 % a v případě kořenů vzrostla na hodnotu 185 %. Výsledky naznačují, že xenobiotika přijímaná kořeny jsou v kořenech rovněž metabolizována na polárnější, těkavější či méně škodlivé metabolity, které jsou následně transportovány buďto do okolí či do listové části rostliny, kde ale kvůli svým pozměněným vlastnostem nepůsobí tak škodlivým účinkem jako v kořenové části.

Trendu odpovídá i stanovení enzymové aktivity glutathion-S-transferas pomocí nativní elektroforézy, kde u vzorků kořenů kromě 2-hydroxyibuprofenu zapříčinil vyšší aktivitu i ketoprofen. Výsledky nativní elektroforézy NADPHoxidasy se trendu

vymykají, a aktivity listů naopak mnohem převyšují aktivitu vzorků kořenů. Mezi vzorky listů byla o malý rozdíl oproti kontrole nejvyšší aktivita odpovídající vzorku rostliny rostoucí v prostředí 2-hydroxyibuprofenu. Mezi vzorky kořenů způsobil nejvyšší aktivitu vliv ketoprofenu malý rozdíl oproti kontrole.

8. Závěr

Získané výsledky, jak z hlediska fytoextrakce, tak i biochemických analýz, naznačují možnost extrakce studovaných xenobiotik do kořenové tkáně a následnou translokaci do nadzemních částí rostliny. Tento fakt dokumentuje, že se nejedná pouze o sorpci na kořeny, ale že studované látky jsou přijímány dovnitř kořenů, interagují s rostlinným metabolismem a jsou translokovány do nadzemních částí, čímž může docházet ke kontaminaci potravních řetězců, a tedy i vlivu na vyšší organismy. V tomhle smyslu je nutné ještě dodat, že analyzovány byly pouze mateřské sloučeniny. Lze předpokládat, že v průběhu rostlinného metabolismu dochází k enzymatickým transformacím studovaných látek na další sloučeniny, u kterých není známá ani míra toxicity, ani fyziologické dopady a které mohou mít vliv na bezpečnost či nezávadnost potravy.

9. Seznam použité literatury a informačních zdrojů

[1] KOŽÍŠEK, František a PUMANN, Petr. Léčiva v pitné vodě a vliv médií. Online. Envigogika. 2013, roč. 8, č. 3. ISSN 1802-3061. Dostupné z: https://doi.org/10.14712/18023061.388. [cit. 2024-04-20].

[2] PEREIRA, André; SILVA, Liliana; LARANJEIRO, Célia; LINO, Celeste a PENA, Angelina. Selected Pharmaceuticals in Different Aquatic Compartments: Part II—Toxicity and Environmental Risk Assessment. Online. Molecules. 2020, roč. 25, č. 8. ISSN 1420-3049. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/molecules25081796. [cit. 2024-04-20].

[3] SILVA, Liliana J.G.; LINO, Celeste M.; MEISEL, Leonor M. a PENA, Angelina. Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. Online. Science of The Total Environment. 2012, roč. 437, s. 185-195. ISSN 00489697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.021. [cit. 2024-04-20].

[4] GONZALEZ-REY, Maria a BEBIANNO, Maria João. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel Mytilus galloprovincialis? Online. Environmental Pollution. 2013, roč. 173, s. 200-209. ISSN 02697491. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.018. [cit. 2024-04-20].

[5] Národní zdravotnický informační portál: nesteroidní protizánětlivé léky. Dostupné z URL:<https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/942> [cit. 2024-02-18]

[6] CAMU, Frederic a VANLERSBERGHE, Caroline. Pharmacology of systemic analgesics. Online. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology. 2002, roč. 16, č. 4, s. 475-488. ISSN 15216896. Dostupné z: https://doi.org/10.1053/bean.2002.0262. [cit. 2024-04-20].

[7] RAINSFORD, K. D. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. Online. Inflammopharmacology. 2009, roč. 17, č. 6, s. 275-342. ISSN 0925-4692. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10787-009-0016-x. [cit. 2024-02-18].

[8] BROCKS, Dion R a JAMALI, Fakhreddin. The Pharmacokinetics of Ibuprofen in Humans and Animals. Online. In: RAINSFORD, K D (ed.). Ibuprofen. CRC Press, 1999, s. 87-142. ISBN 9780429153389. Dostupné z: https://doi.org/10.4324/9781482295382-4. [cit. 2024-02-18].

[9] SCHNEIDER, HT; NUERNBERG, B; DIETZEL, K a BRUNE, K. Biliary elimination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients. Online. British Journal of Clinical Pharmacology. 1990, roč. 29, č. 1, s. 127-131. ISSN 0306-5251. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1990.tb03613.x. [cit. 2024-02-18].

[10] GOULD, Harry J; ENGLAND, John D; SOIGNIER, R.Denis; NOLAN, Porter; MINOR, Lerna D et al. Ibuprofen blocks changes in nav 1.7 and 1.8 sodium channels associated with complete freund's adjuvant–induced inflammation in rat. Online. The Journal of Pain. 2004, roč. 5, č. 5, s. 270-280. ISSN 15265900. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jpain.2004.04.005. [cit. 2024-02-18].

[11] JAMALI, Fakhreddin a BROCKS, Dion R. Clinical Pharmacokinetics of Ketoprofen and Its Enantiomers. Online. Clinical Pharmacokinetics. 1990, roč. 19, č. 3, s. 197-217. ISSN 0312-5963. Dostupné z: https://doi.org/10.2165/00003088-199019030-00004. [cit. 2024-04-20].

[12] KOKKI, Hannu. Ketoprofen Pharmacokinetics, Efficacy, and Tolerability in Pediatric Patients. Online. Pediatric Drugs. 2010, roč. 12, č. 5, s. 313-329. ISSN 1174-5878. Dostupné z: https://doi.org/10.2165/11534910-000000000-00000. [cit. 2024-04-20].

[13] SIÓDMIAK, Joanna; SIÓDMIAK, Tomasz; TARCZYKOWSKA, Agata; CZIRSON, Katarzyna; DULĘBA, Jacek et al. Metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acid derivatives (profens). Online. Medical Research Journal. 2017, roč. 2, č. 1, s. 1-5. ISSN 2451-4101. Dostupné z: https://doi.org/10.5603/MRJ.2017.0001. [cit. 2024-02-19].

[14] Rençber, S.; Karavana, S.Y.; Özyazici, M. Bioavailability File: Ketoprofen. *FABAD J. Pharm. Sci.* **34**, 203–216 (2009).

[15] MARSIK, Petr; REZEK, Jan; ŽIDKOVÁ, Monika; KRAMULOVÁ, Barbora; TAUCHEN, Jan et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic. Online. Chemosphere. 2017, roč. 171, s. 97-105. ISSN 00456535. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.055. [cit. 2024-02-19].

[16] Státní ústav pro kontrolu léčiv: Dodávky léčiv – se zaměřením na léčivé látky – rok 2023. Dostupné z URL: <https://www.sukl.cz/rok-2023> [cit. 2024-02-19].

[17] LI, W.C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Online. Environmental Pollution. 2014, roč. 187, s. 193-201.

ISSN 02697491. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015. [cit. 2024-02-19].

[18] WANG, Huan; JIN, Mingkang; MAO, Wenfeng; CHEN, Cijia; FU, Linya et al. Photosynthetic toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on green algae Scenedesmus obliquus. Online. Science of The Total Environment. 2020, roč. 707. ISSN 00489697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136176. [cit. 2024-04-30].

[19] MEZZELANI, M.; GORBI, S.; DA ROS, Z.; FATTORINI, D.; D'ERRICO, G. et al. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in Mytilus galloprovincialis. Online. Marine Environmental Research. 2016, roč. 121, s. 31-39. ISSN 01411136. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.005. [cit. 2024-02-19].

[20] GONZALEZ-REY, Maria a BEBIANNO, Maria João. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel Mytilus galloprovincialis. Online. Aquatic Toxicology. 2014, roč. 148, s. 221-230. ISSN 0166445X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.011. [cit. 2024-02-19].

[21] MOHD ZANURI, Norlaila Binti; BENTLEY, Matthew G. a CALDWELL, Gary S. Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra®) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates. Online. Marine Environmental Research. 2017, roč. 127, s. 126-136. ISSN 01411136. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.005. [cit. 2024-02-19].

[22] PEREIRA, André; SILVA, Liliana; LARANJEIRO, Célia; LINO, Celeste a PENA, Angelina. Selected Pharmaceuticals in Different Aquatic Compartments: Part II—Toxicity and Environmental Risk Assessment. Online. Molecules. 2020, roč. 25, č. 8. ISSN 1420-3049. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/molecules25081796. [cit. 2024-02-19].

[23] JAN-ROBLERO, Janet a CRUZ-MAYA, Juan A. Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. Online. Molecules. 2023, roč. 28, č. 5. ISSN 1420-3049. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/molecules28052097. [cit. 2024-02-19].

[24] PAROLINI, Marco; BINELLI, Andrea a PROVINI, Alfredo. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve Dreissena polymorpha. Online.

Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011, roč. 74, č. 6, s. 1586-1594. ISSN 01476513. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.025. [cit. 2024-02-19].

[25] FERRANDO-CLIMENT, Laura; COLLADO, Neus; BUTTIGLIERI, Gianluigi; GROS, Meritxell; RODRIGUEZ-RODA, Ignasi et al. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. Online. Science of The Total Environment. 2012, roč. 438, s. 404-413. ISSN 00489697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.073. [cit. 2024-02-19].

[26] CSCE Annual Conference: *OCCURRENCE OF IBUPROFEN AND 2-HYDROXY IBUPROFEN IN SAINT LAWRENCE RIVER*. Dostupné z URL:< https://legacy.csce.ca/elf/apps/CONFERENCEVIEWER/conferences/2019/pdfs/PaperPDFversion_39_0509095653.pdf> [cit. 2024-02-19]

[27] DVOŘÁKOVÁ BŘEZINOVA, Tereza; VYMAZAL, Jan; KOŽELUH, Milan a KULE, Lumír. Occurrence and removal of ibuprofen and its metabolites in full-scale constructed wetlands treating municipal wastewater. Online. Ecological Engineering. 2018, roč. 120, s. 1-5. ISSN 09258574. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.020. [cit. 2024-02-20].

[28] MARCHLEWICZ, Ariel; GUZIK, Urszula; HUPERT-KOCUREK, Katarzyna; NOWAK, Agnieszka; WILCZYŃSKA, Sylwia et al. Toxicity and biodegradation of ibuprofen by Bacillus thuringiensis B1(2015b). Online. Environmental Science and Pollution Research. 2017, roč. 24, č. 8, s. 7572-7584. ISSN 0944-1344. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11356-017-8372-3. [cit. 2024-02-20].

[29] STANCOVA, V.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; ZIVNA, D.; BARTOSKOVA, M. et al. Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (Tinca tinca). Online. Veterinární medicína. 2017, roč. 62, č. 2, s. 90-97. ISSN 03758427. Dostupné z: https://doi.org/10.17221/125/2016-VETMED. [cit. 2024-02-20].

[30] LOFRANO, Juliana; MIRARCHI, Federico; RICO, Catalina; MEDESANI, Daniel A. a RODRÍGUEZ, Enrique M. Inhibition of Oocyte Maturation in the Estuarine Crab Neohelice Granulata, by the Effect of Anti-Inflammatory Drugs. Online. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2022, roč. 109, č. 3, s. 431-435. ISSN 0007-4861. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00128-022-03586-4. [cit. 2024-02-20].

[31] ALIKO, Valbona; KORRIKU, Regi Subashi; PAGANO, Maria a FAGGIO, Caterina. Double-edged sword: Fluoxetine and ibuprofen as development jeopardizers and apoptosis' inducers in common toad, Bufo bufo, tadpoles. Online. Science of The Total Environment. 2021, roč. 776. ISSN 00489697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145945. [cit. 2024-02-20].

[32] HAN, Sunyoung; CHOI, Kyungho; KIM, Jungkon; JI, Kyunghee; KIM, Sunmi et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (Oryzias latipes) and freshwater cladocerans Daphnia magna and Moina macrocopa. Online. Aquatic Toxicology. 2010, roč. 98, č. 3, s. 256-264. ISSN 0166445X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.013. [cit. 2024-02-20].

[33] MARSIK, P.; SISA, M.; LACINA, O.; MOTKOVA, K.; LANGHANSOVA, L. et al. Metabolism of ibuprofen in higher plants: A model Arabidopsis thaliana cell suspension culture system. Online. Environmental Pollution. 2017, roč. 220, s. 383-392. ISSN 02697491. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.074. [cit. 2024-02-21].

[34] TYUMINA, Elena; SUBBOTINA, Maria; POLYGALOV, Maxim; TYAN, Semyon a IVSHINA, Irina. Ketoprofen as an emerging contaminant: occurrence, ecotoxicity and (bio)removal. Online. Frontiers in Microbiology. 2023, roč. 14. ISSN 1664-302X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1200108. [cit. 2024-02-21].

[35] WANG, Jun; ZHAO, Shu-qi; ZHANG, Meng-ya a HE, Bing-shu. Targeted eco-pharmacovigilance for ketoprofen in the environment: Need, strategy and challenge. Online. Chemosphere. 2018, roč. 194, s. 450-462. ISSN 00456535. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.020. [cit. 2024-02-21].

[36] PAWŁOWSKA, Barbara; TELESIŃSKI, Arkadiusz; SYSA, Marcin; GODELA, Agnieszka; ŠČUREK, Radomír et al. Ibuprofen and Ketoprofen—Inert Drugs or Potential Environmental Hazard? Online. Sustainability. 2023, roč. 15, č. 2. ISSN 2071-1050. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/su15021613. [cit. 2024-02-22].

[37] MANJARRÉS-LÓPEZ, D.P.; PEÑA-HERRERA, J.M.; BENEJAM, L.; MONTEMURRO, N. a PÉREZ, S. Assessment of wastewater-borne pharmaceuticals in tissues and body fluids from riverine fish. Online. Environmental Pollution. 2023, roč. 324. ISSN 02697491. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121374. [cit. 2024-02-22].

[38] RANGASAMY, Basuvannan; HEMALATHA, Devan; SHOBANA, Chellappan; NATARAJ, Bojan a RAMESH, Mathan. Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (Danio rerio) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. Online. Chemosphere. 2018, roč. 213, s. 423-433. ISSN 00456535. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.013. [cit. 2024-02-22].

[39] EZECHIÁŠ, Martin; JANOCHOVÁ, Jana; FILIPOVÁ, Alena; KŘESINOVÁ, Zdena a CAJTHAML, Tomáš. Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as in vitro antagonists for human estrogen and androgen receptors. Online. Chemosphere. 2016, roč. 152, s. 284-291. ISSN 00456535. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.067. [cit. 2024-02-22].

[40] ALI, Hazrat; KHAN, Ezzat a SAJAD, Muhammad Anwar. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. Online. Chemosphere. 2013, roč. 91, č. 7, s. 869-881. ISSN 00456535. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075. [cit. 2024-02-24].

[41] BARTWAL, Arti; MALL, Rakesh; LOHANI, Pushpa; GURU, S. K. a ARORA, Sandeep. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. Online. Journal of Plant Growth Regulation. 2013, roč. 32, č. 1, s. 216-232. ISSN 0721-7595. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00344-012-9272-x. [cit. 2024-02-25].

[42] CHERIAN, DeepthiA; PETER, Tim; NARAYANAN, Anjhana; MADHAVAN, SanupaS; ACHAMMADA, Sylvana et al. Malondialdehyde as a marker of oxidative stress in periodontitis patients. Online. Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences. 2019, roč. 11, č. 6. ISSN 0975-7406. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_17_19. [cit. 2024-02-25].

[43] TATZBER, Franz; GRIEBENOW, Sirid; WONISCH, Willibald a WINKLER, Rudolf. Dual method for the determination of peroxidase activity and total peroxides-iodide leads to a significant increase of peroxidase activity in human sera. Online. Analytical Biochemistry. 2003, roč. 316, č. 2, s. 147-153. ISSN 00032697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00652-8. [cit. 2024-02-25].

[44] PANDAY, Arvind; SAHOO, Malaya K; OSORIO, Diana a BATRA, Sanjay. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. Online. Cellular & Molecular Immunology. 2015, roč. 12, č. 1, s. 5-23. ISSN 1672-7681. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/cmi.2014.89. [cit. 2024-02-25].

[45] SHEEHAN, David; MEADE, Gerardene; FOLEY, Vivienne M. a DOWD, Catriona A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Online. Biochemical Journal. Roč. 360, č. 1. ISSN 02646021. Dostupné z: https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001. [cit. 2024-02-26].

[46] PEEK, James a CHRISTENDAT, Dinesh. The shikimate dehydrogenase family: Functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. Online. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2015, roč. 566, s. 85-99. ISSN 00039861. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.006. [cit. 2024-02-26].

[47] SAVCHENKO, Tatyana a TIKHONOV, Konstantin. Oxidative Stress-Induced Alteration of Plant Central Metabolism. Online. Life. 2021, roč. 11, č. 4. ISSN 2075-1729. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/life11040304. [cit. 2024-02-26].

[48] SENTHILKUMAR, M.; AMARESAN, N.; SANKARANARAYANAN, A.; SENTHILKUMAR, M.; AMARESAN, N. et al. Estimation of Malondialdehyde (MDA) by Thiobarbituric Acid (TBA) Assay. Online. In: Plant-Microbe Interactions. Springer Protocols Handbooks. New York, NY: Springer US, 2021, s. 103-105. ISBN 978-1-0716-1079-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_25. [cit. 2024-02-29].

[49] HÝSKOVÁ, Veronika; BĚLONOŽNÍKOVÁ, Kateřina; ŠMERINGAIOVÁ, Ingrida; KAVAN, Daniel; INGR, Marek et al. How is the activity of shikimate dehydrogenase from the root of (parsley) regulated and which side reactions are catalyzed? Online. Phytochemistry. 2021, roč. 190. ISSN 00319422. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112881. [cit. 2024-02-29].

[50] SPOUSTOVÁ, Petra; HÝSKOVÁ, Veronika; MÜLLER, Karel; SCHNABLOVÁ, Renata; RYŠLAVÁ, Helena et al. Tobacco susceptibility to Potato virus YNTN infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content. Online. Plant Science. 2015, roč. 235, s. 25-36. ISSN 01689452. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.017. [cit. 2024-02-29].

[51] BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Online. Analytical Biochemistry. 1976, roč. 72, č. 1-2, s. 248-254. ISSN 00032697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3. [cit. 2024-02-29].

[52] RICCI, Giorgio; BELLO, Mario Lo; CACCURI, Anna Maria; GALIAZZO, Francesca a FEDERICI, Giorgio. Detection of glutathione transferase activity on

polyacrylamide gels. Online. Analytical Biochemistry. 1984, roč. 143, č. 2, s. 226-230. ISSN 00032697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90657-2. [cit. 2024-03-01].

[53] LIBIK-KONIECZNY, Marta; KOZIERADZKA-KISZKURNO, Małgorzata; DESEL, Christine; MICHALEC-WARZECHA, Żaneta; MISZALSKI, Zbigniew et al. The localization of NADPH oxidase and reactive oxygen species in in vitro-cultured Mesembryanthemum crystallinum L. hypocotyls discloses their differing roles in rhizogenesis. Online. Protoplasma. 2015, roč. 252, č. 2, s. 477-487. ISSN 0033-183X. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00709-014-0692-2. [cit. 2024-03-01].