

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Medicinální chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



Adéla Herčíková

Interakce vybraných antidepresiv s vyššími rostlinami jako model environmentální
kontaminace
Interaction of selected antidepressants with higher plants as a model of environmental
contamination

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

V Praze dne:

Adéla Herčíková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli panu doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., za jeho vstřícný přístup a odborné vedení, které mi byly nesmírně cennou pomocí při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za jejich neustálou podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

V posledních letech nabývá na významu studium reziduí farmak v životním prostředí, které se zdají být odpovědné za řadu nežádoucích ekotoxikologických vlivů. Významné místo mezi farmaky zauímají psychofarmaka, jejichž spotřeba dramaticky vzrůstá a je vhodné hledat způsoby odstranění z ekosystému a posoudit možnosti kontaminace potravních řetězců. Práce se týká studia fytoextrakce psychofarmak mianserinu a olanzapinu. Mianserin patří mezi tetracyklická antidepresiva (TCA). Využívá se především k léčbě deprese, úzkosti a poruch spánku. Olanzapin patří do skupiny atypických antipsychotik. Je využíván k léčbě psychotických stavů, jako je schizofrenie a schizoafektivní poruchy. Fytoextrakce je ekologicky šetrný proces, který umožňuje odstranění zbytkových koncentrací znečišťujících látek z vodních ekosystémů. Tyto látky se mohou uvolnit do životního prostředí i po průchodu čistírnou odpadních vod. Bohužel i úprava vody na pitnou nedokáže zcela odstranit zbytkové koncentrace farmaceutických látek. S tím souvisí neustálé hledání nových metod dekontaminace odpadních vod. V této práci byly k fytoextrakčním experimentům využity rostliny kukuřice seté (*Zea mays* L). Kultivační experimenty prokázaly při výchozí koncentraci obou látek 5 mg/l pokles koncentrace mianserinu za 48 h na 7% jeho původní koncentrace v mediu, u olanzapinu během 96 h klesla jeho koncentrace pod 1% původní hodnoty. Koncentrace byly stanovovány pomocí HPLC. Při studiu extrahovatelných reziduí bylo zjištěno, že k podstatně vyšší translokaci do nadzemních částí dochází u mianserinu.

Dále byl sledován vliv mianserinu a olanzapinu na metabolismus rostlin. Byly stanoveny aktivity volných a membránově vázaných peroxidáz, které převážně vykazovaly zvýšení oproti kontrolní rostlině. Aktivita guajakolperoxidázy i ABTS-peroxidázy se jak v listech, tak v kořenech projevila opět zvýšením oproti nekontaminované kontrole. Dále bylo stanoveno množství proteinů dle Bradforda a provedena elektroforetická separace za nativních podmínek, kde byla stanovována aktivita glutathiontransferázy a volných peroxidáz. Nejvíce izoform glutathiontransferázy bylo nalezeno v listech rostlin kontaminovaných mianserinem.

Klíčová slova: *mianserin, olanzapin, fytoextrakce, HPLC, odpadní vody*

Abstract

In recent years, the study of drug residues in the environment, which appear to be responsible for a number of adverse ecotoxicological effects, has become increasingly important. Psychopharmaceuticals have a prominent place among the pharmaceuticals, the consumption of which is increasing dramatically and it is appropriate to look for ways to remove them from the ecosystem and to assess the possibility of contamination of food chains. This work concerns the study of phytoextraction of psychopharmaceuticals mianserin and olanzapine. Mianserin belongs to the tetracyclic antidepressants (TCAs). It is mainly used to treat depression, anxiety and sleep disorders. Olanzapine belongs to the group of atypical antipsychotics. It is used to treat psychotic conditions such as schizophrenia and schizoaffective disorders. Phytoextraction is an environmentally friendly process that allows the removal of residual concentrations of pollutants from aquatic ecosystems. These pollutants can be released into the environment even after passing through a wastewater treatment plant. Unfortunately, even the treatment of water for drinking purposes cannot completely remove residual concentrations of pharmaceutical substances. This has led to a constant search for new methods of wastewater decontamination. In this work, seed corn (*Zea mays* L) plants were used for phytoextraction experiments. Cultivation experiments showed that at a starting concentration of both substances of 5 mg/l, the concentration of mianserin decreased to 7% of its original concentration in the medium in 48 h, while for olanzapine, within 96 h, its concentration dropped below 1% of the original value. Concentrations were determined by HPLC. In a study of extractable residues, it was found that significantly higher translocation to aerial parts occurs with mianserin.

Furthermore, the effect of mianserin and olanzapine on plant metabolism was investigated. The activities of free and membrane-bound peroxidases were determined and mostly showed an increase compared to the control plant. Guaiacol peroxidase and ABTS-peroxidase activities in both leaves and roots showed an increase again compared to the uncontaminated control. Furthermore, the amount of proteins was determined according to Bradford assay and electrophoretic separation was performed under native conditions to determine the activity of glutathione transferase and free peroxidases. Most glutathione transferase isoforms were found in the leaves of mianserin-contaminated plants.

Key words: *mianserin, olanzapine, phytoextraction, HPLC, wastewater*

Obsah

PODĚKOVÁNÍ.....	3
ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
POUŽITÉ ZKRATKY	8
1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE	10
3. PŘEHLED PROBLEMATIKY	11
3.1 LÉČIVA V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ.....	11
3.1.1 Životní cyklus léčiv	12
3.1.2 Psychofarmaka v životním prostředí.....	12
3.1.3 Účinky znečištění léčivy na lidské zdraví	13
3.2 PSYCHOFARMAKA	14
3.2.1 Klasifikace psychofarmak	15
3.3 ANTIDEPRESIVA	16
3.3.1 Mechanismus působení:	16
3.3.2 Mianserin.....	17
3.4 ANTIPSYCHOTIKA	18
3.4.1 Olanzapin.....	18
3.5 DETOXIKAČNÍ PROCESY V ROSTLINÁCH	19
3.6 ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM ROSTLIN.....	20
3.6.1 Neenzymový antioxidační systém rostlin	20
3.6.2 Enzymový antioxidační systém rostlin	20
3.6.2.1 Peroxidázy.....	20
3.6.2.2 Guajakolperoxidáza	21
Mezi její hlavní funkce patří katalýza oxidace fenolických látek (tedy zejména guajakolu) za přítomnosti peroxidu vodíku. Tento enzym patří do III. třídy peroxidáz. ³⁶	21
3.7 FYTOREMEDIACE.....	21
3.7.1 Typy fytoremediace	21
3.7.1.1 Rhizofiltrace	22
3.7.1.2 Fytodegradace	22
3.7.1.3 Rhizodegradace.....	22
3.7.1.4 Fytostabilizace	22
3.8 KUKUŘICE SETÁ	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	24
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	25
4.3 POUŽITÝ ROSTLINNÝ MATERIÁL	26
4.4 PRACOVNÍ POSTUP.....	26
4.4.1 Příprava sterilních semen:	26
4.4.2 Výsadba a kultivace rostlin	26
4.4.3 Zpracování rostlinného materiálu.....	27
4.4.6 Extrahovatelná rezidua.....	28
4.4.7 Analýza pomocí HPLC	28
4.5 POPIS PRACOVNÍHO POSTUPU PRO BIOCHEMICKOU ANALÝZU ROSTLIN	29
4.5.1 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení aktivity enzymů	29
4.5.2 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda	29
4.5.3 Stanovení aktivity volných peroxidáz přeměňujících substrát ABTS	30
4.5.4 Stanovení aktivity celkových volných peroxidáz	30
4.5.5 Stanovení aktivity membránově vázaných peroxidáz	30
4.5.6 Stanovení aktivity guajakolperoxidázy	30
4.5.7 Nativní elektroforéza	31

4.5.7.1 Příprava gelů pro elektroforézu	31
4.5.7.2 Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy	31
4.5.7.3 Detekce aktivity volných peroxidáz v gelu	32
4.5.7.4 Detekce aktivity glutathion-S-transferázy v gelu	32
5 VÝSLEDKY	33
5.1 KALIBRACE HPLC	33
5.2 FYTOEXTRAKCE MIANSERINU	33
5.3 FYTOEXTRAKCE OLANZAPINU	35
5.4 EXTRAHOVATELNÁ REZIDUA	36
5.5 VÝSLEDKY BIOCHEMICKÉ ANALÝZY ROSTLIN.....	36
5.5.1 Celkový obsah rozpustných proteinů	37
5.5.2 Stanovení aktivity ABTS-peroxidázy.....	38
5.5.3 Stanovení aktivity volných a membránově vázaných peroxidáz.....	39
5.5.4 Stanovení aktivity guajakolperoxidázy	40
5.5.6 Detekce aktivity izoform enzymů po elektroforetické separaci za nativních podmínek	41
5.5.6.1 Aktivita a izoformy volných peroxidáz	41
5.5.6.2 Aktivita a izoformy glutathiontransferázy	42
6 DISKUZE.....	45
7 ZÁVĚR.....	47
8 ZDROJE:	48

Použité zkratky

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
CAT	kataláza
SOD	superoxiddismutáza
PXs	peroxidázy
GPX	glutathionperoxidáza
APX	askorbátperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
DHAR	dehydroaskorbátreduktáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. limit of quantification)
PPCP	farmaka a produkty osobní péče (z angl. pharmaceuticals and personal care products)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SSRI	slektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (z angl. selective serotonin reuptake inhibitors)
UV	ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)

1. Úvod

Rozvoj vědy a techniky přispěl rozhodujícím způsobem ke zvýšení životní úrovně lidské společnosti, prodloužení střední délky života a stárnutí populace, což s sebou nese i negativní jevy např. vyšší nemocnost populace. S vyšší nemocností zároveň úměrně roste i spotřeba léčiv, jejich expanzivní rozvoj a snadnější dostupnost. S vyšší spotřebou léčiv roste i zájem o analýzy metabolismu léčiv, a rovněž jejich reziduí, která mohou pronikat do komunálního odpadu a tím jej kontaminovat řadou toxických látek (xenobiotik). Léčiva patří v současné době mezi významné polutanty (chemická látka, která má v určité koncentraci a délce působení negativní vliv na živý organismus). Tyto látky zůstávají v životním prostředí poměrně dlouho v aktivní biologické formě a jejich dopad na životní prostředí není přesně známý. Tato situace otevírá řadu diskusí například ohledně možného nárůstu klinicky významných bakterií, rezistentních vůči dosud účinným lékům v první řadě antibiotikům.

Důležitou roli zde mohou sehrát i předpokládané klimatické změny, spojené s obdobími sucha a nedostatkem vody. V kombinaci s dalším předpokladem rostoucího počtu obyvatel planety toto představuje závažný problém v oblasti ekotoxikologie.

Rezidua metabolismu léčiv či jejich nezměněné formy vstupují do vodního řetězce několika cestami. Hlavní cestou proniknutí je jejich vyloučení (močí, stolicí) do odpadních vod a následně do čistíren odpadních vod. Zde probíhající procesy nejsou na takové úrovni, aby stoprocentně eliminovaly všechna xenobiotika a zamezily vzrůstající koncentraci zdraví škodlivých látek v přírodě. Část těchto reziduí se může dostat do povrchových vod a kontaminovat tak vodní organismy.

Mezi další cesty patří nemocniční odpady, odpadní vody z průmyslové výroby a průsaky skládek odpadních vod, což vede ke zvyšování koncentrace léčiv v životním prostředí¹. Metody pro odstranění těchto látek se tak stávají z ekotoxikologického hlediska jednou z prioritních záležitostí.

2. Cíle práce

Projekt bakalářské práce je zaměřen na fytoextrakci psychoaktivních substancí mianserinu a olanzapinu z hlediska fytoimediačních technologií a zároveň z hlediska možnosti posouzení potravinových řetězců. Pro řešení zadaného úkolu byly vytyčeny základní cíle:

1. *Příprava modelové testovací kultury rostlin Zea mays L*
2. *Provést fytoextrakční experimenty u obou studovaných substancí (olanzapinu a mianserinu) metodou sterilní hydroponické kultivace na médiu obohaceném o studované sloučeniny se sledováním časové závislosti úbytku polutantu.*
3. *Časový úbytek sledovat pomocí HPLC analýz na základě kalibrační závislosti.*
4. *Stanovit vliv použitých psychofarmak na metabolismus rostlin kukuřice seté.*
 - *Stanovit aktivitu volných a membránově vázaných peroxidáz, ABTS-peroxidázy a guajakolperoxidázy*
 - *Detekce izoforem glutathiontransferázy a peroxidáz pomocí nativní elektroforetické separace.*
5. *Vyhodnocení fytoextrakční účinnosti v časové závislosti a vztahu k tvorbě biomasy*
6. *Stanovení extrahovatelných reziduí*
7. *Posouzení fytoimediačního potenciálu kukuřice seté vůči olanzapinu a mianserinu*

3. Přehled problematiky

3.1 Léčiva v životním prostředí

PPCP (pharmaceuticals and personal care products) zahrnují léčiva na předpis i bez předpisu, nelegální drogy a veterinární léčiva jako např. antibiotika, hormony, antidepresiva, nesteroidní protizánětlivé látky, regulátorů lipidů apod., která mohou unikat do životního prostředí, a tím kontaminovat daný ekosystém. K tomuto jevu dochází především vylučováním léčiv a jejich metabolitů močí. Další možnost, jak mohou PPCP znečistit životní prostředí je, že to jsou produkty emisí z lékařských, průmyslových, zemědělských, nebo domácích aktivit. Kategorie PPCP zahrnuje i řadu dalších látek jako jsou nejrůznější kosmetické přípravky např. opalovací krémy, mýdla, repelenty a šampony, které rovněž mohou vykazovat nežádoucí biologickou aktivitu.

V současné době se výzkum cíleně zaměřuje především na stanovení reziduí farmak v životním prostředí a to především v povrchových vodách, které jsou následně zdrojem kontaminace celého ekosystému. Léčiva a jejich metabolity byly celosvětově nalezeny v odpadních a povrchových vodách v rozmezí koncentrací řádově ng/l až µg/l.

V současné době existuje několik metod čištění odpadních vod, které ale neodstraňují efektivně všechny PPCP.²

Problematika reziduí léčiv je spjata s řadou karcinogenních, mutagenních a reprodukčních toxických rizik. Mnohé PPCP působí jako endokrinní modifikátory, které narušují funkce hormonálních systémů u lidí i zvířat. Byly zjištěny vazby mezi endokrinními disruptory a nedávnými případy zvýšeného výskytu rakoviny prsu a prostaty. Důležitým aspektem znečištění vod je také ovlivnění fauny a flory. Bylo například zjištěno, že psychoaktivní léčivo oxazepam v koncentracích relevantních pro životní prostředí způsobuje u okounů evropských zvýšenou rychlost krmení, snížení sociability a zvýšenou aktivitu.

Světová zdravotnická organizace (WHO) definovala rezistenci vůči antibiotikům jako jeden z hlavních problémů veřejného zdraví 21. století. V USA se ročně předepíše více než 250 milionů antibiotik a rozsáhlé užívání antibiotik vede k jejich zvýšené koncentraci v odpadu.²

3.1.1 Životní cyklus léčiv

Životní cyklus léčiv byl popsán zkratkou LADME – the liberation, absorption, distribution, metabolism, excretion, což v překladu znamená, že se léčiva nejprve uvolní, pak vstřebají, distribuují, metabolizují a nakonec jsou vyloučeny ven. V současnosti se za jeden z největších problémů spjatých s touto tematikou považují odpadní vody. Patří sem odpadní vody z domácností, nemocnic, průmyslu a ze zemědělství. Dříve nebylo považováno znečištění způsobené likvidací průmyslových odpadů za významný faktor, ale současné výzkumy ukazují, že některé výrobní továrny mohou způsobovat znečištění na mnohem vyšší úrovni³ Například byly zaznamenány velmi vysoké koncentrace venlafaxinu v čistírně odpadních vod, do které byly vypouštěny odpadní vody z velkého průmyslového závodu poblíž Jeruzaléma v Izraeli.¹⁹

Výzkum provedený v městských řekách v Pekingu, Changzhou a Shenzhenu v Číně identifikoval 28 chemických sloučenin, které spadají do pěti různých terapeutických kategorií. Výsledky studie ukázaly, že antibiotika tvořila přibližně polovinu všech zjištěných kontaminantů. Mezi sloučeniny s nejvyššími průměrnými koncentracemi patřily sulfadimethoxin, sulpirid a atenolol.

Screening vzorků surové pitné vody ve švýcarském Lausanne odhalil přítomnost 37 léčivých látek, čtyř hormonů a různých dalších mikropolutantů. Podobně výzkum na Pyrenejském poloostrově zjistil přítomnost léčiv a produktů osobní péče ve všech čtyřech řekách, přičemž koncentrace léčiv a hormonů byly vyšší než koncentrace produktů osobní péče.²

3.1.2 Psychofarmaka v životním prostředí

Psychofarmakům je věnována speciální pozornost nad ostatními terapeutickými skupinami hlavně ze dvou důvodů. První z nich je spojen s jejich rozšířeným užíváním, které dle některých autorů podpořila i koronavirová krize. Druhým důvodem je jejich potenciál vyvolat ekotoxikologické poškození.⁴

Terapeutické cíle a fyziologické systémy, na které psychofarmaka působí se netýkají výhradně člověka. Mnoho z těchto struktur a signálních drah jsou přítomné také u jiných živých organismů. Některé behaviorální testy, například úzkosti, strachu nebo stresu, kde se testují experimentální léčiva se provádějí na rybách.²⁰

Ryby sdílejí mnoho neurotransmiterů a signálních drah s námi. Biogenní monoaminy, jako je např. serotonin, dopamin, noradrenalin apod. se vyskytují jak u obratlovců, tak u bezobratlých. Tyto látky jsou z evolučního hlediska tak staré, že se vyskytují i v organismech mimo živočišnou říši. Acetylcholin je například přítomen u hub a bakterií,²¹ serotonin se nachází u rostlin.²²

V rostlinách se mohou například hromadit benzodiazepiny, které mohou působit na jejich GABAergní systém.²³ Sertralin (antidepresivum) ovlivňuje sedimentární nitrifikační procesy tím, že mění mikrobiální trofický řetězec.²⁴

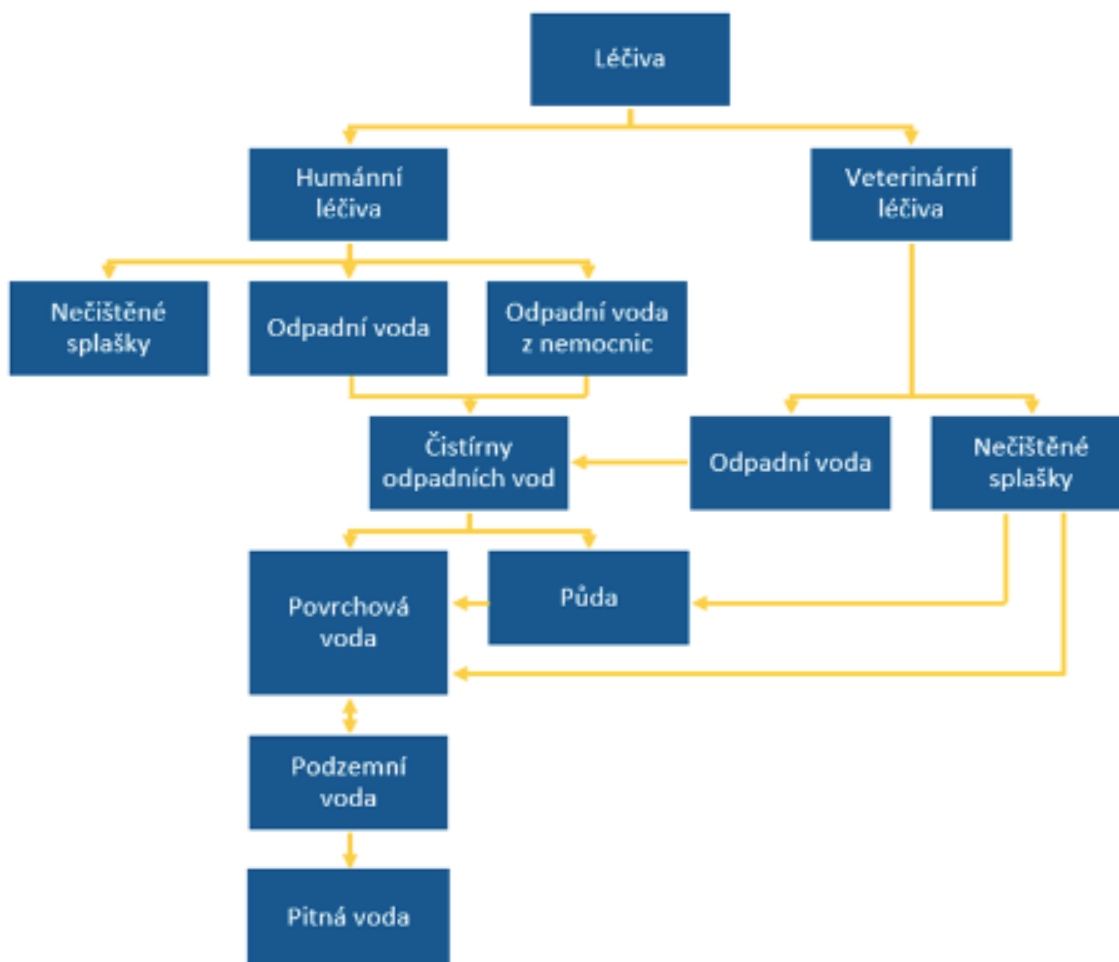
3.1.3 Účinky znečištění léčivy na lidské zdraví

Vliv znečištění psychofarmaky na lidské zdraví je doposud poměrně málo prozkoumán. Organizace WHO zveřejnila v roce 2012 zprávu, kde dospěla k závěru, že koncentrace psychofarmak ve vodovodní vodě by neměla představovat žádné zdravotní problémy.²⁵

Přítomnost psychofarmak v životním prostředí by však mohla být problém pro nejzranitelnější skupiny pacientů, např. alergiky²⁶

Pravděpodobně nejznámějším příkladem škodlivého účinku na lidské zdraví v důsledku znečištění léčivy je nárůst počtu bakterií s rezistencí vůči antibiotikům, což je v dnešní době považováno za největší celosvětový problém spojený s touto problematikou v oblasti veřejného zdraví. Zde je zásadní filozofie „jednoho zdraví“, která se domnívá, že lidské zdraví úzce souvisí se zdravím životního prostředí.²⁷

Někteří autoři naznačují, že psychoaktivní látky přítomné v životním prostředí mohou být potencionálně spojeny s lidskými neuropsychiatrickými poruchami, jako je autismus, Alzheimerova choroba, nebo schizofrenie, protože jsou schopny překročit bariéry ovlivňující vývoj embryonálního mozku.²⁸



Obrázek 1: Transport léčiv v životním prostředí, převzato od ALS Czech Republic, s.r.o.

3.2 Psychofarmaka

Psychofarmaka patří mezi léčiva, která mají vliv na centrální nervovou soustavu, a proto je řadíme mezi psychoaktivní látky. Psychofarmaka musí být za fyziologických podmínek lipofilní, aby mohla přecházet z krevního řečiště skrz hematoencefalickou bariéru. Jde o velmi rozmanitou skupinu léčiv, která zahrnuje anestetika, analgetika, antidepresiva, anxiolytika, antipsychotika, stimulantia atd.⁵

Farmakologicky jsou často definována podle svých interakcí s buněčnými enzymy a neuromediátorovými receptory a/nebo transportními proteiny.

Tyto léky ovlivňují duševní funkce a zároveň se využívají k léčbě duševních poruch. Mohou ovlivňovat vědomí (bdělost), afektivní složku a psychickou interakci (myšlení). Psychofarmaka se dělí do různých skupin s ohledem na indikace, přičemž primární jsou léky proti depresi (antidepresiva) a mánii (antimanika, dysforika, thymopofylaktika), léky na zlepšení duševní činnosti a paměti, léky proti demenci a na zlepšení mozkového metabolismu

(nootropika, kognitiva), léky na uklidnění a snížení úzkosti (anxiolytika, trankvilizéry), léky navozující spánek (hypnotika) nebo naopak stimulující léky (psychostimulancia) a v neposlední řadě sem patří léky při léčbě schizofrenie (neuroleptika, antipsychotika)

Psychofarmaka jsou malé molekuly, které ovlivňují chemický přenos nervového signálu, mají různé mechanismy účinku, který je zpravidla spojen s ovlivněním neurotransmiterů, které mají za úkol inhibovat, nebo naopak zesílit jejich účinek. Při hledání těchto mechanismů, které vedou ke vzniku duševních poruch jsme do značné míry odkázáni na nepřímé metody, především na studium mechanismů účinku psychotropních látek v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Modernější léky mají relativně selektivnější účinek s ohledem na žádoucí působení na příslušný transmitter nebo jeho receptor, což snižuje výskyt nežádoucích vedlejších účinků. ⁶

3.2.1 Klasifikace psychofarmak

Psychofarmaka lze rozdělit podle účinku na duševní funkce. Tento způsob klasifikace je uveden v tab.1⁷

Tabulka 1: Rozdělení psychofarmak podle účinku na duševní funkce

Parametr	smysl ovlivnění	skupina psychofarmak
Látky ovlivňující bdělost a stav vědomí	pozitivní účinek	psychostimulancia
	negativní účinek	hypnotika, narkotika
Látky ovlivňující afektivitu	pozitivní účinek	antidepresiva, anxiolytika
	negativní účinek	antimanika
Látky ovlivňující úroveň psychické inteligence	pozitivní účinek	antipsychotika
	negativní účinek	delirogeny, halucinogeny
Látky ovlivňující paměť	pozitivní účinek	kognitiva a nootropní látky
	negativní účinek	amnesticky účinné látky

3.3 Antidepresiva

Antidepresiva představují skupinu léků s nejrůznější chemickou strukturou a mechanismem účinku. Jejich hlavní funkcí je ovlivnění příznaků deprese a dalších symptomů depresivního chování.⁸ Tyto léky byly uvedeny na trh před 60 lety. Terapeutické indikace zprvu zahrnovaly jen depresivní poruchy, ale jejich využití je mnohem širší, mezi další indikace antidepresiv patří např. úzkostné poruchy (panická porucha a agorafobie, sociální fobie, obsedantně kompulsivní porucha-OCD, posttraumatická stresová porucha- PTSD, generalizovaná úzkostná porucha-GAD). Tyto léky mohou být také používány při chronické bolesti a v neposlední řadě nacházejí své využití v léčbě nespavosti a u poruch příjmu potravy. Indikační spektrum těchto léčiv je velmi rozsáhlé, největší „boom“ vznikl mezi lety 2003 až 2008, kdy stoupla preskripce těchto léků téměř o 100%.⁹

Z klinického hlediska je tedy nezbytné znát jak mechanismus účinku, tak i možné důsledky a interakce s ostatními léčivy. Cílem léčby antidepresivy je dosažení, pokud možno plné remise, která by mohla teoreticky nastat v rozmezí od 4 týdnů (deprese) až po 3 měsíce u obsedantně kompulsivní poruchy.

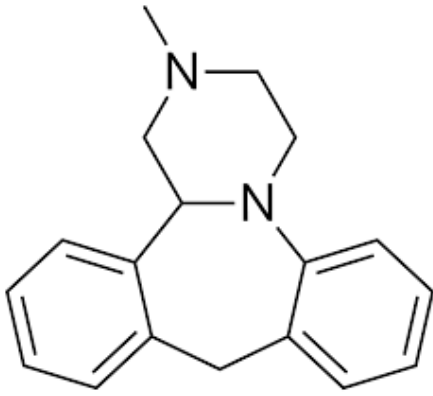
3.3.1 Mechanismus působení:

Prakticky všechna antidepresiva působí na dysfunkční noradrenergí (NA) a serotogéní neurotransmiterové systémy. Úloha hlavního noradrenergího jádra, locus coeruleus (LC) a jeho projekci do limbických struktur, frontální a prefrontální oblasti v etiologii deprese byla dlouho neobjasněna. Dříve se předpokládala jeho snížená aktivita, která by vedla ke snížené hladině NA. Později však v preklinických studiích bylo prokázáno, že maximální stimulace inhibičních alfa2 adrenergíhých receptorů vede k antidepresivnímu účinku.¹⁰

Úloha serotoninu (5-HT) v etiologii deprese zůstává stále nejasná. Veškerý 5-HT je syntetizován z aminokyseliny L-tryptofanu v hlavním serotonergním jádře. Deplece tohoto prekursoru u zdravých dobrovolníků s příbuznými 1.stupně trpících depresí způsobuje depresivní náladu.¹¹ V mozku se vyskytuje celkem 14 různých 5-HT receptorů, z nichž nejdůležitějším pro antidepresiva jsou podtypy 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C a 5-HT1A.

3.3.2 Mianserin

Mianserin patří mezi tzv. tetracyklická antidepresiva (TCA). TCA jsou látky, které zvyšují koncentraci monoaminů (noradrenalinu, serotoninu a dopaminu) v limbické oblasti. Primárně se tak děje blokadou jejich zpětného vychytávání. Tyto látky také ovlivňují celou řadu dalších receptorových systémů včetně muskarinových, histaminových a adrenergických. Mezi další zástupce TCA patří: Imipramin, Desipramin, Dibenzepin nebo např. Doxepin. Mimo antidepresiva je mianserin také řazen i do skupiny noradrenergických a specifických serotoninergních antidepresiv (NaSSA), stejně jako jeho analog mirtazapin. Z hlediska farmakodynamiky má mianserin kombinované noradrenergické a serotoninergní působení, je inhibitor zpětného vychytávání NA a antagonist (inverzní agonista), adrenergických a histaminových receptorů. Mianserin prakticky neovlivňuje cholinergní systém. Pokud je mianserin podán perorálně je rychle a dobře absorbován. Farmakokinetické parametry jsou uvedeny v tabulce č. 1. Lék lze podávat 1x za den vzhledem k dlouhému eliminačnímu poločasu. Stálé plazmatické hladiny je dosaženo za 6 dnů. Mianserin podléhá extenzivnímu hepatálnímu metabolismu, převážně cestou demethylace a oxidace a následné konjugace. Během 7-9 dnů je vyloučen v moči (4-7%) a ve stolici (14-28%). Mianserin je dobře snášen pacienty a to i pacienty s kardiovaskulárním onemocněním. Dobře ho snáší i pacienti ve vyšším věku. Oproti látkám TCA vykazuje při předávkování méně kardiotoxických účinků. V terapeuticky účinných dávkách takřka neovlivňuje kardiovaskulární soustavu a nemá prakticky žádné anticholinergní účinky. Mianserin má též sedativní vlastnosti, které jsou způsobovány jeho antagonistickým působením na histaminové H_1 a α_1 receptory. Vyšší sedace se objevuje na počátku léčby a při dlouhodobé léčbě se sedativní účinky snižují. Dále je pacienty uváděno zvýšení tělesné hmotnosti nebo hypotenze. U pacientů, u kterých byl aplikován, byl též zjištěn úbytek kostní dřeně, což se zpravidla projevovalo jako granulocytopenie nebo agranulocytoza.¹²



Obrázek 2: Struktura mianserinu

3.4 Antipsychotika

Léčiva, které se používají v léčbě schizofrenie, psychotických stavů, tlumení neklidu a agresivity. Všechna antipsychotika blokuji dopaminové neuroreceptory. Jednotlivá antipsychotika se liší mírou blokady D₂ receptorů a působení na dalších receptorech.

3.4.1 Olanzapin

Olanzapin je antipsychotikum 2. generace ze skupiny MARTA (Multi-Acting Receptor Targeted Antipsychotics), chemicky thienobenzodiazepin. Tato látka má široké farmakologické působení na řadu receptorových systémů: 5-HT_{2A/2C},

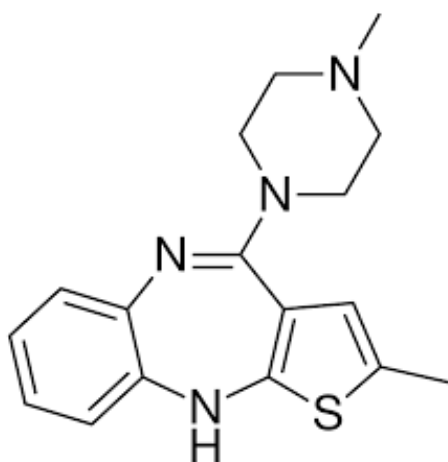
5-HT₃, 5-HT₆, dopaminové D₁, D₂, D₃, D₄, D₅, cholinergní muskarinové receptory (M₁-M₅), α₁-adrenergní a histaminové H₁ receptory. Olanzapin má vyšší afinitu k serotoninovým 5HT₂ receptorům než k dopaminovým D₂ receptorům.

Farmakokinetika po perorálním podání je ovlivněna věkem (nad 65 let), absencí kouření a pohlavím (ženy). U pacientů ve věku nad 65 let byl zjištěn poločas 51,8 hodin a u mladších pacientů pak 33,8 hodin. Platí, že vstřebávání není ovlivněno potravou. Orod disperzivní forma je bioekvivalentní k tabletové formě. Metabolity vykazují nižší farmakologickou aktivitu než olanzapin. Renální insuficience u pacientů, ve srovnání se zdravými, nezpůsobovala významný rozdíl poločasu eliminace nebo clearance.

Při perorálním podání je olanzapin účinný v léčbě pozitivních, negativních i afektivních příznaků schizofrenního onemocnění oproti placebo. Klinicky významné je také antimanické působení olanzapinu ve srovnání s placebem. U bipolární deprese dosahoval p.o. olanzapin ve

srovnání s placebem více odpovědí a remisí. Po dosažení remise z manické fáze BAP byl olanzapin více efektivní v udržovací léčbě než placebo následujících 12 měsíců.

Jako nežádoucí účinky při perorálním podání je uváděna ospalost, přibývání na váze v průměru 6 kg za rok, vyšší chuť k jídlu, zvýšené hladiny cholesterolu, glukózy a triglyceridů, glykosurie, obstipace, akatizie, parkinsonismus, anticholinergní účinky, přechodné asymptomatické zvýšení jaterních transamináz, eozinofilie, vyrážka, astenie popř. únava a otoky.¹²



Obrázek 3: Struktura olanzapinu

3.5 Detoxikační procesy v rostlinách

Stejně jako jiné živé organismy jsou i rostliny otevřeným systémem, který je ovlivňován svým okolím. V průběhu života jsou rostliny vystaveny vlivu cizorodých látek (xenobiotik) nejrůznější povahy a původu. Snahou rostlin je eliminovat vliv těchto látek, protože mohou na organismus působit toxicky. Způsob obrany se liší v závislosti na chování xenobiotik vůči buňce, hlavně vůči biologickým membránám. Méně nebezpečné jsou pro rostliny látky, které neprojdou přes plazmatickou membránu (nejčastěji polární, hydrofilní povahy). Na druhé straně nepolární, lipofilní látky mohou samovolně přejít přes membránu a ovlivňovat metabolismus buňky.

Pokud nastane tato situace, tak se buňka snaží vypořádat s existencí xenobiotika mechanismy souhrnně zvanými detoxikační reakce. I přes řadu výzkumů platí, že u rostlin jsou informace o přeměně cizorodých látek stále nedostačující. Xenobiotika vstupují do rostlin a jsou jí

zpracovávána. Během detoxikace rostlina chemicky mění danou látku tak, aby ji buňka mohla transportovat do kompartmentů, kde neškodí, a tím je eliminována její toxicita. Detoxikační reakce lze podle typu reakce rozdělit do tří fází: derivační, konjugační a exkrece¹⁴

3.6 Antioxidační systém rostlin

Rostliny musí být schopné přizpůsobit se změnám ve vnějším prostředí a chránit se před patogeny. Jejich metabolismus proto musí být dostatečně adaptivní. Nepříznivé podmínky a útoky patogenů vyvolávají rostlině stres, což vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS)²⁹. Mezi ROS patří např. peroxid vodíku (H₂O₂), singletový kyslík (¹O₂), hydroxylový radikál (HO•) a další molekuly s vysokou reaktivitou odvozené od kyslíku. Hlavními zdroji ROS v rostlinách jsou fotorespirace, fotosyntéza, fixace dusíku a stres.³⁰ Aby se předešlo oxidativnímu poškození, musí být ROS co nejrychleji redukovány pomocí antioxidačního systému rostlin.²⁹

3.6.1 Neenzymový antioxidační systém rostlin

Askorbát (ASC) a glutathion (GSH) patří mezi klíčové molekuly, které tvoří neenzymatickou část antioxidačního systému rostlin. Tyto látky se nachází v cytoplazmě, mitochondriích, peroxisomech a chloroplastech, přičemž ASC se navíc nachází i v apoplastu. Hlavní funkcí těchto látek je ochrana buňky před oxidativním poškozením. ASC a GSH také figurují jako součást signálních drah³¹

3.6.2 Enzymový antioxidační systém rostlin

Mezi hlavní enzymy antioxidačního systému rostlin patří superoxiddismutáza (SOD), kataláza (CAT), peroxidázy (PXs), glutathionperoxidáza (GPX), askorbátperoxidáza (APX), glutathionreduktáza (GR) a dehydroaskorbátreduktáza (DHAR). Tyto enzymy zařizují degradaci ROS. Enzymový a neenzymový antioxidační systém mezi sebou vzájemně spolupracují.³²

3.6.2.1 Peroxidázy

Peroxidázy patří mezi homoproteiny. Vyskytují se v nejrůznějších izoformách. Jejich molekulová hmotnost je okolo 50 kDa.³³ Jsou schopny oxidovat více substrátů v přítomnosti peroxidu vodíku a často obsahují prostetickou skupinu ferroporphyrin IX. Množství

izoforem v rostlinách se zvyšuje díky posttranslačním modifikacím³⁴. Peroxidázy jsou klasifikovány do tří tříd, z nichž třídy I a III jsou přítomny v rostlinách. Do třídy I patří například askorbátperoxidáza (APX), zatímco zástupcem třídy III je guajakolperoxidáza (GuPX)³⁵. Peroxidázy, které patří do III. třídy mají mnoho dalších funkcí. Účastní se různých fyziologických procesů, např. metabolismu auxinů, polymerizace složek buněčných stěn a obrana proti patogenům.³⁶

3.6.1.2 Guajakolperoxidáza

Mezi její hlavní funkce patří katalýza oxidace fenolických látek (tedy zejména guajakolu) za přítomnosti peroxidu vodíku. Tento enzym patří do III. třídy peroxidáz.³⁶

3.7 Fytoremediace

Fytoremediace je technologie využívající zelené rostliny nebo rostliny ve spojení s mikroorganismy k rozkladu, fixaci nebo akumulaci různých látek znečišťujících půdu, vodu a vzduch. Moderní fytoremediace je stále na počátku vývoje, k němuž přispívá hlavně narůstající porozumění molekulárním a biochemickým mechanismům metabolických dějů v rostlinách.¹⁴

3.7.1 Typy fytoremediace

Fytoextrakce je metoda, při které rostliny akumulují kontaminant, pak jsou sklizeny a zpracovány. Tímto způsobem se odstraňují hlavně ionty kovů, ale lze takto odstraňovat i metaloidy, radionuklidy nebo nekovy. Nejvhodnější jsou pro fytoextrakci rostliny, které snášejí vysoké koncentrace kovů, akumulují velké množství kovů v nadzemních částech (kontaminované části lze jednoduše sklídit), mají rozsáhlý kořenový systém, rychle rostou a produkují velké množství biomasy. Patří sem např. rostliny z čeledi Brassicaceae (brukvovité). Existují i rostliny s výrazně vyšší akumulací schopností, většinou patřících do skupiny sukulentů. Nevýhodou těchto rostlin je ovšem jejich pomalý růst, tím i malé množství biomasy a také nejde o rostliny široce rozšířené a snadno kultivovatelné v reálných podmínkách. Cestou pro vývoj rostlin s příznivějšími vlastnostmi pro fytoextrakci může být např. šlechtění tradičních plodin s tendencemi hyperakumulovat kovy nebo křížení hyperakumulátorů.¹⁴

3.7.1.1 Rhizofiltrace

Dochází k absorpci, koncentraci a precipitaci xenobiotik z proudící vody kořeny živých rostlin. Tímto způsobem je možné čistit povrchové, odpadní nebo extrahované podzemní vody obsahující nízké koncentrace kovů nebo radionuklidů. Lze použít jak suchozemské i vodní rostliny. Rostlinou využívanou při dekontaminaci vod znečištěných kovy a zejména radionuklidy, je slunečnice roční. Hojně jsou také využívány mokřadní rostliny jako orobinec, rákos, sítina či ostřice.¹⁴

3.7.1.2 Fytodegradace

Využívá rostliny a s nimi asociovanou mikroflóru k degradaci kontaminantů na netoxické látky. Tuto metodu lze využít při dekontaminaci půdy, sedimentů, kalů, podzemní vody i povrchové vody znečištěné organickými látkami, jako jsou výbušniny, chlorovaná rozpouštědla, herbicidy či insekticidy. Metodu fytodegradace lze využít tam, kde produktem metabolických aktivit jsou látky netoxické nejen pro rostliny, ale i pro ostatní organismy.¹⁴

3.7.1.3 Rhizodegradace

Neboli rostlinami podporovaná bioremediace, je metoda, kdy jsou organické látky v půdě často rozloženy na jednodušší látky nebo jsou kompletně mineralizovány na CO₂ a H₂O pomocí bakterií, které se v půdě běžně vyskytují a jejichž množství a různorodost mohou být ovlivněny přítomností kořenů rostlin a jejich působením. Velkou výhodou rhizodegradace je, že není nutné rostliny sklízet a zpracovávat je, protože v nich nedochází k akumulaci kontaminantu.¹⁴

3.7.1.4 Fytostabilizace

Fytostabilizace využívá vegetace ke snížení mobility kontaminantů (hlavně kovů), přičemž dochází k zabránění jejich migrace do podzemní vody (prosakování), transportu větrem a k jejich vstupu do potravního řetězce. Ke snížení transportu kontaminantu v půdě, sedimentu nebo v kalu dochází např. absorpcí a akumulací kontaminantu kořeny, oxidací či redukcí, převedením na nerozpustnou formu nebo zabudováním do ligninu či do humusové složky půdy při procesu humifikace. Hlavní výhodou fytostabilizace je, že kontaminovaná půda se nemusí těžit a odvážet, vegetaci lze použít in situ.

Naproti tomu nevýhodou fytostabilizace je dlouhá doba remediace, neboť kontaminant není odstraňován, ale zůstává na místě., proto je nutné zajistit, aby v budoucnu nedošlo k opětovnému uvolnění kontaminantu do prostředí. Vegetaci užitou pro fytostabilizaci je v řadě případů nutné podpořit hnojením nebo modifikací půdních vlastností pomocí různých látek aplikovaných do půdy. Využitelnými rostlinami pro fytostabilizaci jsou rostliny schopné snášet danou koncentraci kontaminantu, mající kořeny zasahující do kontaminované oblasti a schopné změnit biologické, chemické nebo fyzikální podmínky v půdě.¹⁴

3.8 Kukuřice setá

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) (dále jen kukuřice) je původní plodinou v tropických a subtropických oblastech Jižní a Střední Ameriky. S pěstováním kukuřice začali již Aztékové, Mayové a Inkové před 5 600 lety. Vzhledem k její značné přizpůsobivosti na okolní podmínky jí lze pěstovat v různém klimatu, nadmořské výšce i při různé délce dne, kdy vegetační doba a světelné podmínky jsou hlavními faktory určujícími, zda je daná geografická oblast vhodná pro její pěstování¹⁵

Kukuřice je jednou z nejdůležitějších zemědělských plodin, a to hlavně díky jejímu širokému využití, jak v lidské potravě, tak jako krmivo pro zvířata. Kukuřice je jednoletá rostlina, která dorůstá do výšky 2 až 3 m, tvoří listy dlouhé až 100 cm a široké 5 až 10 cm. Kromě rozsáhlých adventivních kořenů vytváří ještě nadzemní chůdovité kořeny s opornou funkcí. Jednopohlavní květy jsou rozděleny na samčí květenství tvořící lata klásků a samičí květenství tvořící ztlustělé klasy, tzv. palice¹⁶

Rychlá tvorba velkého množství biomasy, tolerance k vysokým koncentracím těžkých kovů a schopnost jejich hyperakumulace z ní činí vhodnou rostlinu k použití při fytoextrakci těžkých kovů, například kadmia a olova. Ve srovnání s dalšími obilninami má nejlépe prozkoumané geny. Díky svým vlastnostem, jako je rozmanitost nukleotidů, značná velikost heterochromatických chromozomů a genová kolinearita s ostatními lipnicovitými, je kukuřice vhodná pro výzkum genetiky, cytogenetiky i genomiky¹⁷

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (Sigma-Aldrich, USA)
2-amino-2-methylpropanol (Sigma-Aldrich, USA)
3,3'-diaminobenzidin(Sigma-Aldrich,USA)
Acetonitril, gradient grade, for HPLC, $\geq 99.9\%$ (Honeywell, USA)
Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
Bisakrylamid(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)
Fenazin methosulfát (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)
Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR)
Kyselina trihydrogenfosforečná, $\geq 85\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich, USA)
Malondialdehyd (Sigma-Aldrich, USA)
Methanol, gradient grade, for HPLC, $\geq 99.9\%$ (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., ČR)
Síran sodný bezvodý (Lach-Ner, ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (VWR Life Science, USA)
Triethylamin
Olanzapine (Sigma-Aldrich, USA)
Mianserin hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA)

4.2 Použité přístroje

ACD/ChemSketch (Freeware) (ACD/Labs, verze 2020.1.2)
Analytické váhy ABT 120-5DNM (KERN, 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 (Ingos, ČR) – autosampler LCS 5040, gradientové čerpadlo LCP 5020, detektor SPDM20A (Shimadzu)
HPLC kolona Agilent Eclipse XDB-C-18, 5 μm, 250 x 4 mm
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 Použitý rostlinný materiál

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

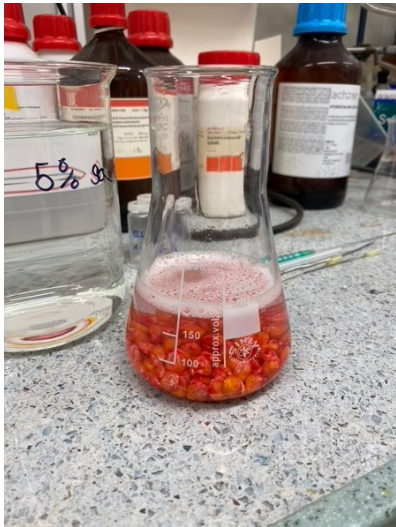
4.4 Pracovní postup

4.4.1 Příprava sterilních semen:

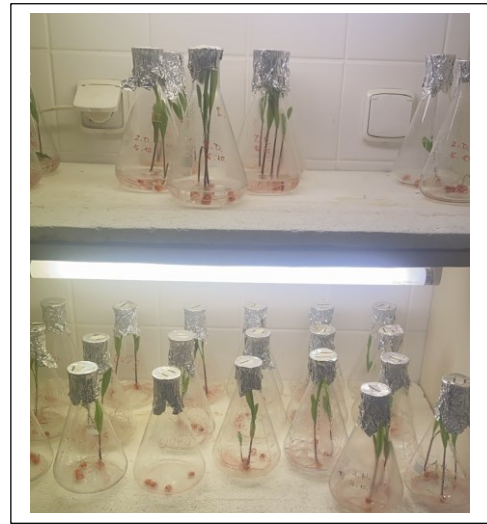
Nejdříve byl připraven roztok Sava o koncentraci 5% a 10%. Následně bylo vybráno padesát semen kukuřice seté, které byly rozděleny na polovinu a vloženy do dvou Erlenmeyerových baněk. K semenům bylo nejprve přidáno 20 ml sterilní vody a ponecháno deset minut. Následně byla odmaštěna v 70% ethanolu po dobu jedné minuty. Poté byla sterilizována 5% roztokem Sava s kapkou Jaru po dobu 5 minut, následně 10% roztokem Sava po dobu 5 minut a nakonec byla dvakrát promyta sterilní destilovanou vodou za aseptických podmínek.

4.4.2 Výsadba a kultivace rostlin

Sterilizované Erlenmeyerovy baňky (500 ml) s 10 ml vodovodní vody byly přeneseny do laminárního boxu. Do každé baňky bylo za sterilních podmínek vneseno 5 sterilizovaných semen kukuřice. Baňky byly uzavřeny hliníkovou folií, která byla nejdříve opálena nad plamenem. Semena byla kultivována v kultivační místnosti při teplotě 26 °C za specifických světelných podmínek (16 hodin světla/8 hodin tmy, zářivky Cool White, 40 W/m² ze vzdálenosti 40 cm). Rostliny zde byly ponechány do požadovaného vzrůstu. Po 7-9 dnech byl odstraněn zbytek media a do každé baňky s rostlinami bylo přidáno 100 ml sterilní vodovodní vody, která byla následně ze zásobního roztoku kontaminována příslušným léčivem. Zásobní roztok léčiva byl připraven rozpuštěním adekvátního množství substance v dimethylsulfoxidu tak, aby přídavek 250 µl zásobního roztoku léčiva do 100 ml kultivačního roztoku vytvořil vstupní koncentraci farmaka 5 mg/l. Vzorky pro analýzy byly odebrány ihned po kontaminaci rostliny léčivem, tedy v čase 0 hod (kontrola počáteční koncentrace) a poté vždy po 24 hodinách po dobu sedmi dní. Vzorky byly následně uchovány v mrazícím boxu. Experiment byl prováděn v 5 souběžných kulturách.



Obrázek 4: Sterilizace semen kukuřice



Obrázek 5: Kultivace rostlin

4.4.3 Zpracování rostlinného materiálu

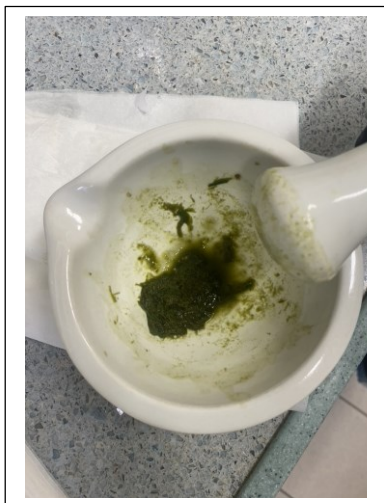
Hned po posledním odběru vzorků byly rostliny vyjmuty z baněk, omyty destilovanou vodou a osušeny pomocí filtračního papíru. Poté byly odděleny zbytky semen, separovány listy od kořenů a oba rostlinné materiály byly zváženy. Postup u všech rostlin byl analogický. Vzorky byly poté zmrazeny kapalným dusíkem a uloženy v mrazícím boxu pro následné biochemické experimenty.



Obrázek 6: Oddělení semen kukuřice seté

4.4.6 Extrahovatelná rezidua

Ze separátních bezodběrových kultivací po dobu 7 dnů byly získány kontaminované rostliny. Kořeny byly odděleny od listů a obě části byly zvlášť zpracovány v třecí misce pomocí tloučku. Pomocí tekutého dusíku byl materiál rozetřen spolu s mořským pískem. K této směsi bylo přidáno 20 ml ethyl-acetátu. Následně byla směs přelita do baňky a ultrazvukována po dobu 5 minut. Suspenze byla zfiltrována a k filtrátu byl přidán bezvodý Na_2SO_4 jako sušidlo. Roztok byl nechán se sušidlem přes noc a druhý den byl přefiltrován a filtrát odpařen do sucha za vakua. Odparek byl zvážen a rozpuštěn v 1 ml methanolu. Před HPLC analýzou byl vzorek 4x zředěn mobilní fází a centrifugován.



Obrázek 7: Homogenizace rostlinného materiálu

4.4.7 Analýza pomocí HPLC

Účinnost fytoextrakce byla analyzována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC). V případě olanzapinu byla využita mobilní fáze, která byla tvořena acetonitrilem a vodou v poměru 7:43 (v/v), k tomuto roztoku bylo přidáno 2,5 ml H_3PO_4 na okyselení a 50 μl triethylaminu, celkový objem roztoku byl jeden litr. Jako mobilní fáze pro mianserin byla použita směs methanol: voda v poměru 1:9 (v/v) a pH roztoku bylo upraveno pomocí H_3PO_4 na pH 3. Obě fáze byly po přípravě ultrazvukovány po dobu 15 minut. V případě mianserinu byla použita gradientová eluce (Roztok A – popsaná mobilní fáze, roztok

B – methanol, gradient: 0-3 min 100% A, 3-6 min 0-100% B, 6-13 min 100 % B, 13-15 min 0-100 %A). V případě olanzapinu byla použita isokratická eluce. Pro analýzu byla použita kolona Agilent Eclipse XDB-C-18, s rychlostí průtoku 1 ml/min a zrnitostí 5 µm za laboratorní teploty. Detekce UV mianserinu bylo provedeno při 233 nm a olanzapinu proběhlo při 270 nm.

Pro účely vyhodnocení koncentrací v měřených vzorcích byla použita kalibrace získaná změřením kalibrační sady roztoků příslušných standardů mianserinu a olanzapinu o koncentracích 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 mg/l. Vlastní vzorky z experimentů byly po rozmražení centrifugovány po dobu pěti minut při 1400 otáčkách za minutu (průměr rotoru 100 mm). Poté bylo aplikováno do chromatografu vždy 20 µl jednotlivých vzorků a měření probíhalo po dobu 15 minut. Výsledky byly zpracovány pomocí programu Clarity.

4.5 Popis pracovního postupu pro biochemickou analýzu rostlin

4.5.1 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení aktivity enzymů

Listy a kořeny byly homogenizovány ve třecí misce za použití kapalného dusíku. Poté bylo k této směsi přidáno čtyřnásobné množství extrakčního pufru následujícího složení: 100 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM dithiotreitol (dále jen DTT) ; 1 mM EDTA a 10 mM askorbát sodný. Poté bylo k této směsi přidáno 4 mg/ml PVP, pro vazbu fenolických látek. Směs byla centrifugována při 15 000 g a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán pomocí automatické pipety a byl použit jako rostlinný extrakt pro stanovení obsahu bílkovin a enzymové aktivity.

4.5.2 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda

V každém z připravených rostlinných extraktů byl stanoven obsah proteinů. Byl vytvořen roztok z 20 µl vhodně zředěného rostlinného extraktu a 200 µl Bradfordova činidla, které byly pipetovány do mikrotitrační destičky, která byla nechána inkubovat po dobu 10 minut při laboratorní teplotě, následně byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Pro kalibraci byly použity různé koncentrace roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) v rozmezí 0,1-0,5 mg/ml.

4.5.3 Stanovení aktivity volných peroxidáz přeměňujících substrát ABTS

Pro stanovení ABTS-peroxidové aktivity bylo přidáno pomocí automatické pipety 80 μl 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0), 5 μl 49 mM peroxidu vodíku, 100 μl již komerčně připraveného roztoku ABTS a 20 μl rostlinného vzorku. Ihned po přidání vzorku byla kontinuálně měřena absorbance po dobu 5 minut při vlnové délce 414 nm a laboratorní teplotě. Měření bylo provedeno dvakrát, vždy ve třech opakováních.

4.5.4 Stanovení aktivity celkových volných peroxidas

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 155 μl 50 mM fosfátového pufru, pH 7,0; 49 mM roztoku H_2O_2 ; 20 μl roztoku DAB o koncentraci 4 mg/ml v 96% (v/v) ethanolu a 20 μl rostlinného extraktu. Ihned poté byla kontinuálně měřena absorbance po dobu 5 minut při vlnové délce 430 nm za laboratorní teploty. Test byl proveden dvakrát ve třech opakováních.

4.5.5 Stanovení aktivity membránově vázaných peroxidas

Sediment získaný při přípravě extraktu (viz výše) byl rozpuštěn v extrakčním pufru (100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,8; 1 mM DTT; 1 mM Na_2EDTA ; 10 mM askorbát sodný) s 1 M NaCl. Směs byla poté centrifugována při zrychlení 15 000 g a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Získaný supernatant byl použit ke stanovení aktivity membránově vázaných peroxidáz. Aktivita byla měřena stejným způsobem jako při stanovení celkových volných peroxidáz (viz výše)

4.5.6 Stanovení aktivity guajakolperoxidázy

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 155 μl 50 mM fosfátového pufru, pH 7,0; 5 μl 49 mM roztoku H_2O_2 ; 20 μl 9 mM roztoku guajakolu a 20 μl rostlinného extraktu. Následně byla ihned kontinuálně měřena absorbance po dobu 5 min při 470 nm za laboratorní teploty. Stanovení bylo provedeno dvakrát ve třech opakováních

4.5.7 Nativní elektroforéza

4.5.7.1 Příprava gelů pro elektroforézu

Pro nativní elektroforézu byl připraven 10% polyakrylamidový separační gel smícháním 7,9 ml destilované vody; 6,7 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5 : 1); 5,0 ml 1,5 mol/l pufru Tris-HCl, pH 8,8; 2 μ l TEMED a 0,2 ml 10% (w/v) roztoku glycerolu. Nakonec bylo přidáno 200 μ l 10% peroxodisíranu amonného k iniciaci polymerace a směs byla nalita mezi čtyři páry elektroforetických skel a převrstvena destilovanou vodou. Po 30 minutách při laboratorní teplotě gel polymeroval. Dále byl připraven 4% zaostřovací gel o složení: 1,22 ml destilované vody; 0,26 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5 : 1); 0,5 ml 0,5 mol/l pufru Tris-HCl, pH 6,8; 0,5 μ l TEMED; 0,02 ml 10% (w/v) roztoku glycerolu; a nakonec 20 μ l 10% peroxodisíranu amonného, který byl nalit na zpolymerovaný separační gel. Aby se vytvořily jamky pro dávkování vzorků, byl do zaostřovacího gelu vložen hřeben, který byl po 30 minutách polymerace při laboratorní teplotě vyjmut. Následně byl připraven elektrodotový pufr (pH 8,3) 18,8 g glycinu, 10 ml 10% glycerolu, 3 g Tris a doplněn do 1 litru deionizovanou vodou.

4.5.7.2 Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy

Listy a kořeny rostlin byly zpracovány pro elektroforetické stanovení stejným způsobem jako pro stanovení enzymových aktivit (viz výše). K 200 μ l připraveného extraktu bylo do mikrozkušavky přidáno 40 mg sacharózy, aby výsledná koncentrace činila 20 % (w/v). Na gel bylo aplikováno takové množství extraktu, aby všechny jamky obsahovaly stejné množství proteinů stanovovaných metodou dle Bradforda. Připravené gely s extrakty byly vloženy do elektroforetické nádoby s již připraveným elektrodotovým pufrem. Do horního oddílu elektroforetické aparatury bylo před zahájením elektroforézy přidáno 100 μ l 0,1 % (w/v) bromfenolové modři k elektrodotovému pufru. Elektroforéza byla zahájena připojením ke zdroji stejnosměrného proudu s počátečním napětím 70 V. V okamžiku, kdy bromfenolová modř vtékala do separačního gelu, byla hodnota napětí zvýšena na 140 V. Ihned poté, když bromfenolová modř dosáhla konce gelu, byla elektroforetická separace ukončena. Po vyjmutí gelů ze skla elektroforetické aparatury byly gely opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do detekčních směsí

4.5.7.3 Detekce aktivity volných peroxidáz v gelu

Pro zobrazení izoenzymů peroxidáz byla připravena detekční směs obsahující 0,01 g 3,3'-diaminobenzidinu (DAB), tato sloučenina slouží jako donor vodíku při peroxidázové aktivitě a umožňuje vizualizaci aktivity enzymu prostřednictvím vzniku tmavě hnědé barvy (polymeru DAB). Sloučenina DAB byla rozpuštěna ve 2,5 ml 96% (v/v) ethanolu. Dále bylo přidáno 7 ml 100 mM fosfátového pufru, pH 7,0; 100 μ l 30% (v/v) H₂O₂ a 0,4 ml destilované vody, aby celkový objem dosáhl 10 ml. Roztok byl sonikován v ultrazvuku po dobu 5 minut. Gel byl v tomto roztoku inkubován přes noc do požadovaného vzhledu při laboratorní teplotě a poté promyt destilovanou vodou. Princip detekce volných peroxidáz je založen na tzv. přímé detekci, čili zobrazení hnědých pruhů na světlém pozadí, kdy počet pruhů značí počet detekovaných izoform.

4.5.7.4 Detekce aktivity glutathion-S-transferázy v gelu

Aktivita izoform glutathiontransferázy byla zjištěna následovně. Přímo po elektroforéze byl gel vložen do 10 ml roztoku I, který se skládal z 10 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 6,5), 0,0138g glutathionu, 0,002 g 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) a 0,0082 g nitroblue tetrazolium chloridu (NBT). Po 10 minutách inkubace byl gel krátce promyt vodou a vložen do 10 ml roztoku II, který se skládal z 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 9,6) a 0,0092 g fenazin methosulfatu (PMS), ve kterém byl ponechán inkubovat do požadovaného zbarvení. Princip detekce aktivity je zde založen na tzv. negativním barvení. Světlejší proužek na tmavém pozadí vyznačuje stanovenou aktivitu glutathion-S-transferázy přítomnou v gelu.

5 Výsledky

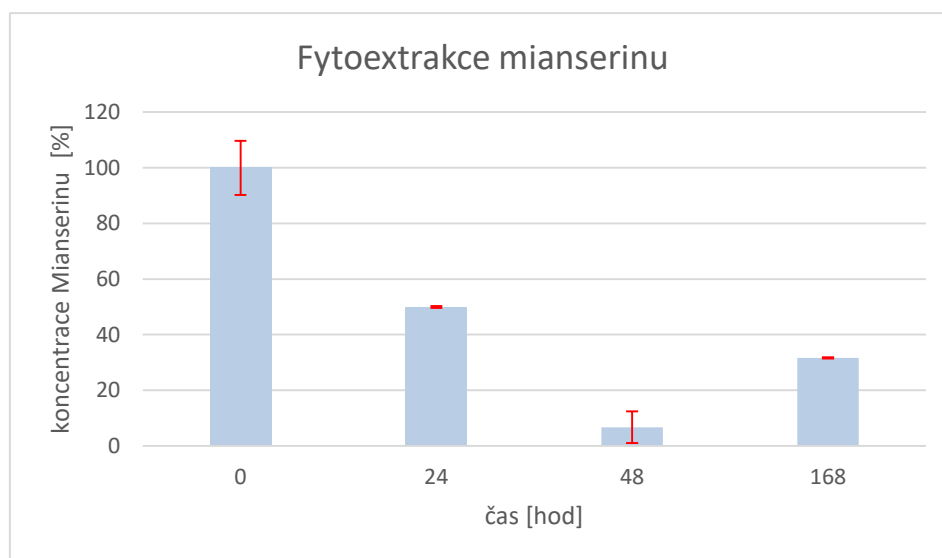
5.1 Kalibrace HPLC

Nejprve byla provedena pro oba substráty kalibrace pomocí roztoků s léčivými látkami o koncentracích 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 mg/l. Kalibrační závislost získaná pomocí chromatografického programu Clarity byla dále použita pro vyhodnocování jednotlivých experimentálních vzorků. Z absolutní hodnoty šumu byly stanoveny limity kvantifikace (LOQ) a limity detekce (LOD), kde LOQ pro mianserin bylo 0,15 mg/l a pro olanzapin 0,06 mg /l a hodnota LOD pro mianserin činila 0,046 mg/l a pro olanzapin 0,018 mg/l.

Kalibrační závislost byla u mianserinu vyhodnocena dle rovnice: $y=47,125x$ s korelačním koeficientem 0,998 u olanzapinu byla vyhodnocena dle rovnice $y=56,275x$ s korelačním koeficientem 0,990

5.2 Fytoextrakce mianserinu

Graf č.1 demonstruje procentuální průměr koncentrace, která je vztažena k počáteční koncentraci, v závislosti na čase, ve kterém byly vodné vzorky odebrány.



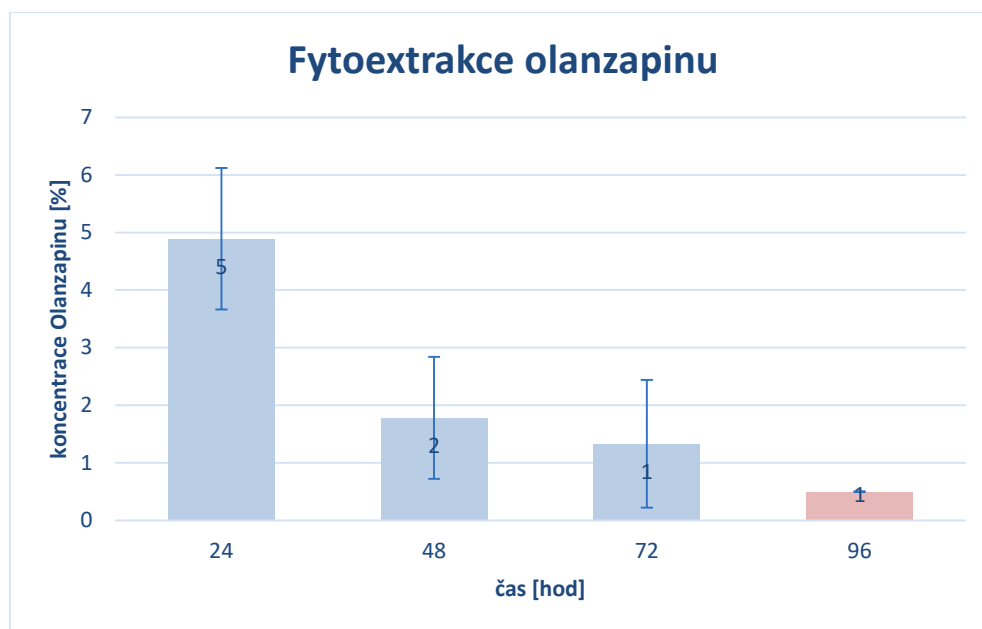
Graf 1: Závislost koncentrace mianserinu ve vodné fázi na čase odběru média (koncentrace jsou vyjádřeny jako procenta výchozí koncentrace studované látky)

Počáteční koncentrace léčiva stanovená metodou HPLC s UV detekcí byla však menší, než předpokládaná koncentrace. Průměrná koncentrace v čase 0 hod byla zjištěna jako 2,06 mg/l, což bylo dále bráno jako výchozí koncentrace, tato hodnota tedy odpovídá 100% v grafu 1. Rozdíl v očekávané a stanovené koncentraci pravděpodobně vznikl díky rychlé adsorpci léčiva na kořeny rostlin. Ke snížení vstupní koncentrace může docházet i v důsledku nemožnosti absolutního odstranění přebytečného média v kultivaci.

Z grafu číslo 1 je patrný prakticky poloviční pokles koncentrace v prvních 24 hodinách, kdy průměrná koncentrace 2,06 mg/l klesla na 1,03 mg/l. Po uplynutí dalších 24 hodin došlo k poklesu koncentrace z 50% na 7%, čili koncentrace se zmenšila o 43%, tato skutečnost může být opět dána sorpcí či extrakcí kořeny použitých rostlin. Během další kultivace byl pozorován nárůst koncentrace mianserinu v kultivačním médiu až na 32%. Tento fakt je pravděpodobně způsoben odumíráním kořenů rostlin, ze kterých se zpětně vylučuje studovaná látka do kultivačního média, pravděpodobně v souvislosti s rozkladem uhynulých kořenů. Po sedmi dnech byla proto kultivace ukončena, Pokud vezmeme v úvahu pouze data ze zdravé, nepoškozené rostliny tak celková koncentrace mianserinu v médiu klesla ze 100% na 7%, čili z 2,06 mg/l na 0,14 mg/l během 48 h.

5.3 Fytoextrakce olanzapinu

Graf č.2 demonstruje pokles koncentrace olanzapinu v závislosti na čase. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta výchozí koncentrace.



Graf 2: Závislost koncentrace olanzapinu ve vodné fázi na čase odběru vzorku z média (Koncentrace jsou vyjádřeny jako procenta výchozí koncentrace studované látky, obdelník (96 h) je barevně odlišený z důvodu koncentrace těsně pod LOQ).

Skutečná počáteční koncentrace léčiva stanovena metodou HPLC s UV detekcí byla nepatrně menší, než teoretická koncentrace. Průměrná koncentrace v čase 0 hod byla analyzována jako 4,9 mg/l, což je bráno jako výchozí koncentrace, tato hodnota tedy odpovídá 100%, to však není znázorněno v grafu z důvodu přehlednosti. Největší pokles se udál během prvních 24 hodin, kdy rapidně klesla průměrná koncentrace z 4,9 mg/l na 0,24 mg/l tato skutečnost pravděpodobně vznikla díky velmi rychlé adsorpci léčiva na kořeny rostlin. Po dalších 24 hodinách opět klesla koncentrace, tentokrát o 3%, čili z 0,24 mg/ na 0,09 mg/l. V následujících 24 hodinách byl taktéž zaznamenán pokles koncentrace z 0,09 mg/l na 0,07 mg/l. V posledních 24 hodinách již byla koncentrace ve vodném médiu velice malá, pohybovala se průměrně okolo 0,05 mg/l. Celková koncentrace olanzapinu rapidně klesla z 4,9 mg/l na 0,05 mg/l.

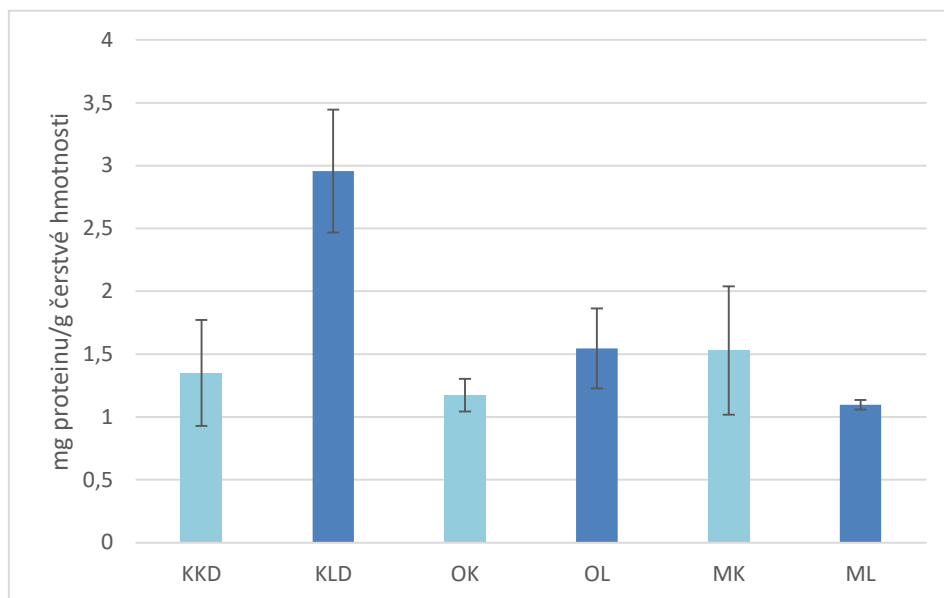
5.4 Extrahovatelná rezidua

Extrahovatelná rezidua představují množství studované látky extrahovatelné z rostlinného pletiva za daných podmínek ve formě volné sloučeniny. Extrakcí do ethyl-acetátu bylo v případě olanzapinu získáno z 4,8 g listů 0,028g extraktu, a z 5,7 g kořenové pletiva 0,013g pevného odparku. V případě mianserinu bylo získáno z 4,0 g listů 0,012 g odparku a z 4,4 g kořenů 0,03 g extraktu. V rozpuštěném odparku z kořenů byla stanovena koncentrace mianserinu 23,43 mg/l, což po přepočtu odpovídá 0,007 mg/g čerstvé hmotnosti. Mianserin byl nalezen pouze v kořenech, v nadzemní části nebyl detekován. U rozpuštěného odparku z kultivace rostlin s olanzapinem byla stanovena koncentrace 3,6 mg/l, což odpovídá 0,003 mg/g čerstvé hmotnosti kořenů, u nadzemní části byla koncentrace 2,46 mg/l, ta odpovídá 0,0026 mg/g čerstvé hmotnosti rostliny

5.5 Výsledky biochemické analýzy rostlin

Sterilně vypěstované rostliny, které se využívaly ve fytoextrakčních experimentech byly následně podrobeny biochemické analýze. Byla zde stanovena aktivita celkových volných a membránově vázaných peroxidáz, peroxidáz které přeměňují substrát ABTS, a guajakolperoxidázy. Stanovení aktivity probíhalo spektrofotometricky, kdy byla sledována změna absorbance v čase. Pro stanovení byla vybrána lineární část z naměřených hodnot absorbance a na základě této lineární části byla vypočtena aktivita enzymu jako změna absorbance na čase a vztažená na gram čerstvé hmotnosti. Aktivity celkových volných peroxidáz a glutathion-S-transferázy byly detekovány pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek.

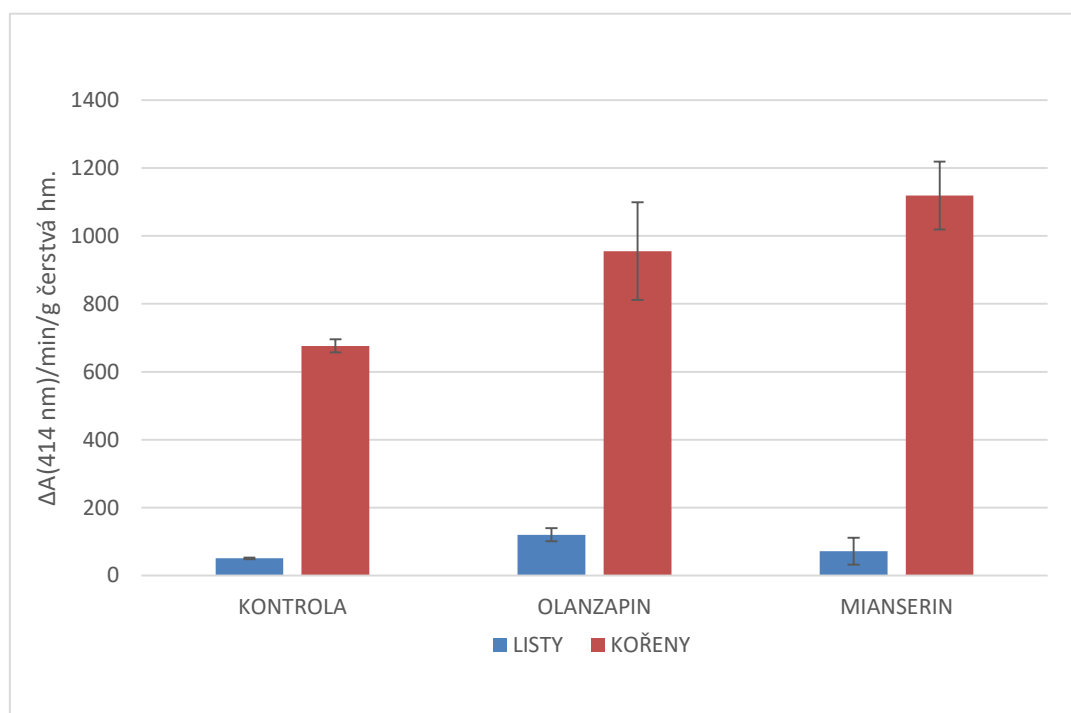
5.5.1 Celkový obsah rozpustných proteinů



Graf 3: Stanovení obsahu rozpustných proteinů v listech a kořenech rostlin kukuřice (KKD-kořeny kontrolní rostliny, KLD-listy kontrolní rostliny, OK- kořeny kontaminované olanzapinem, OL- listy kontaminované olanzapinem, MK-kořeny kontaminované mianserinem, ML- listy kontaminované mianserinem)

Z grafu 3 je patrné, že listy rostlin pěstovaných v přítomnosti léčiv obsahují nižší obsah rozpustných proteinů oproti listům kontrolní rostliny. V případě kořenů kontaminovaných léčivy je množství rozpustných proteinů podobné množství rozpustných proteinů u kořenů kontrolní rostliny. Nejvíce rozpustných proteinů se kromě kontrolní rostliny vyskytuje v listech olanzapinu a nejméně se vyskytuje v listech mianserinu.

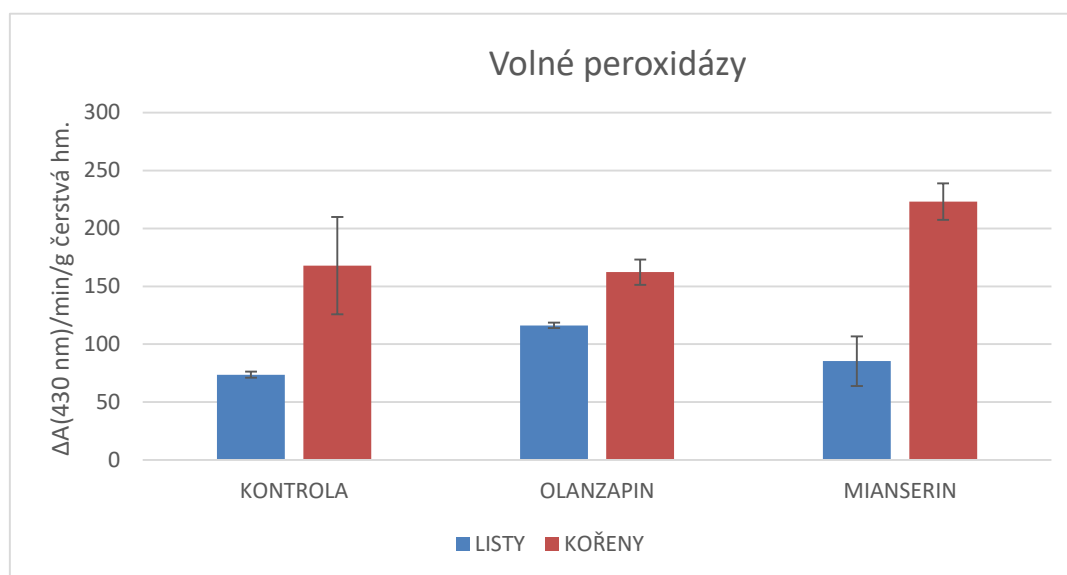
5.5.2 Stanovení aktivity ABTS-peroxidázy



Graf 4: Aktivita ABTS-peroxidázy v listech a kořenech kontrolních rostlin a rostlin pěstovaných s léčivem v médiu.

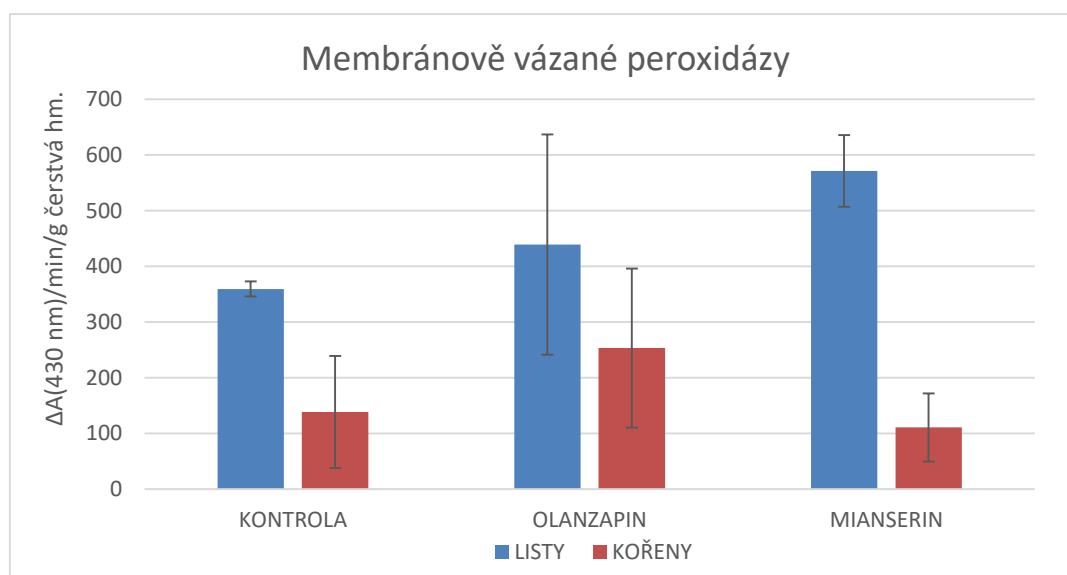
Obecně lze konstatovat, že aktivita ABTS-peroxidázy je mnohem výraznější v kořenech oproti listům. Aktivita v kořenech převyšuje kontrolu v případě obou léčiv. V kořenech kontaminovaných léčivem mianserinem byla stanovena nejvyšší hodnota, a to zhruba o 1/3 vyšší, než v kontrolní skupině. Aktivita v listech je oproti kořenům poměrně nízká a aktivita v listech kontaminovaných léčivem zhruba odpovídá aktivitě v listech kontrolních rostlin.

5.5.3 Stanovení aktivity volných a membránově vázaných peroxidáz.



Graf 5: Aktivita celkových volných peroxidáz v listech a kořenech kontrolních rostlin a rostlin pěstovaných s léčivem v médiu.

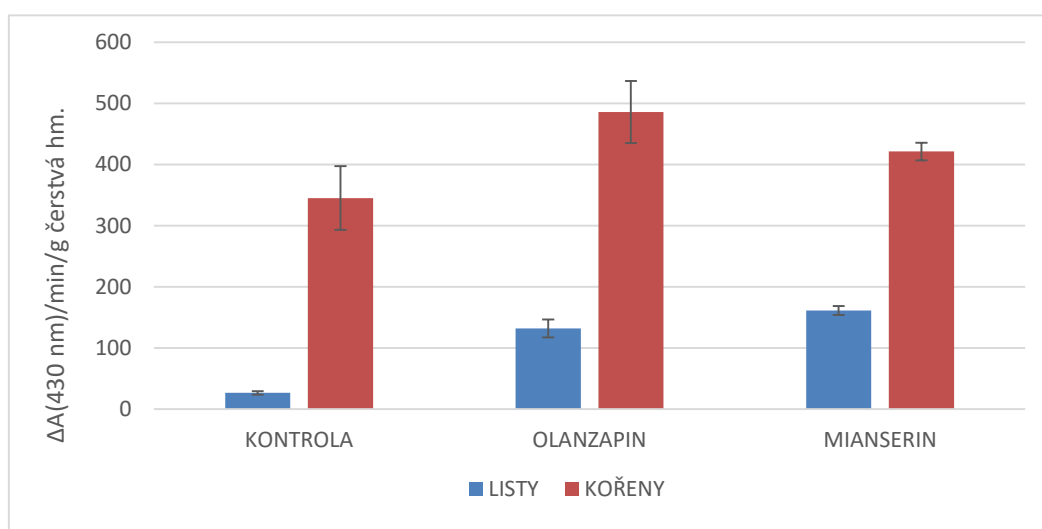
V grafu číslo 4 je vidět dominantní aktivita volných peroxidáz v kořenech rostlin kontaminovaných mianserinem, kdy je průměrná hodnota aktivity o 33% vyšší, než v kontrolní skupině. V případě skupiny rostlin pěstovaných s olanzapinem v médiu aktivita volných peroxidáz v kořenech zhruba odpovídá aktivitě v kořenech kontrolní skupiny. V listech byla nejvyšší aktivita stanovena pro rostliny pěstované s olanzapinem v médiu.



Graf 6: Aktivita membránově vázaných peroxidáz v listech a kořenech kontrolní skupiny rostlin a rostlin pěstovaných s léčivem v médiu.

Z grafu 5 je patrné, že v listech rostlin pěstovaných v přítomnosti mianserinu a olanzapinu byl pozorován nárůst aktivity membránově vázaných peroxidáz oproti kontrolní skupině. Větší rozdíl je pozorován v rostlinách s mianserinem v médiu, kdy je aktivita cca o 1/3 vyšší, než v kontrole. V případě olanzapinu je aktivita doprovázena velkou směrodatnou odchylkou, což může souviset s rozmanitostí měřených vzorků, příp. přesnosti experimentální práce. V případě kořenů je aktivita v rostlinách s mianserinem v médiu lehce nižší, než aktivita v kořenech kontroly. Naopak ve skupině pěstované s olanzapinem je aktivita zhruba o polovinu vyšší, než v kořenech kontrolní rostliny, i když výsledek je opět zatížen relativně vysokou směrodatnou odchylkou.

5.5.4 Stanovení aktivity guajakolperoxidázy



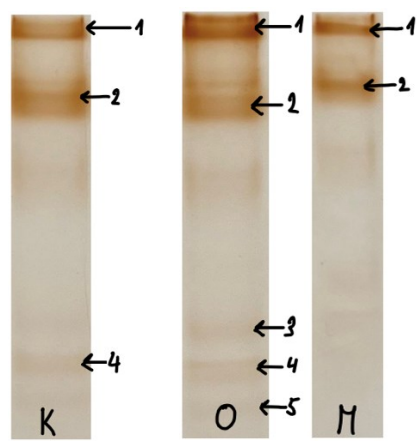
Graf 7: Aktivita guajakolperoxidázy v listech a kořenech kontrolních rostlinách a rostlin pěstovaných s léčivem v médiu.

Z grafu číslo 6 je patrné, že aktivita guajakolperoxidázy je významně vyšší v kořenech oproti listům. Ve všech případech byla aktivita v kořenech velmi vysoká, nejvyšší hodnota byla v rostlinách kontaminovaných olanzapinem. V tomto případě lze pozorovat aktivitu asi o 1/3 vyšší než v kontrolní skupině. V listech je aktivita guajakolperoxidázy obecně nízká a velmi podobná mezi všemi experimentálními skupinami. Kontrolní rostliny vykazují v listech nižší aktivitu, než listy rostlin pěstovaných s léčivem v médiu.

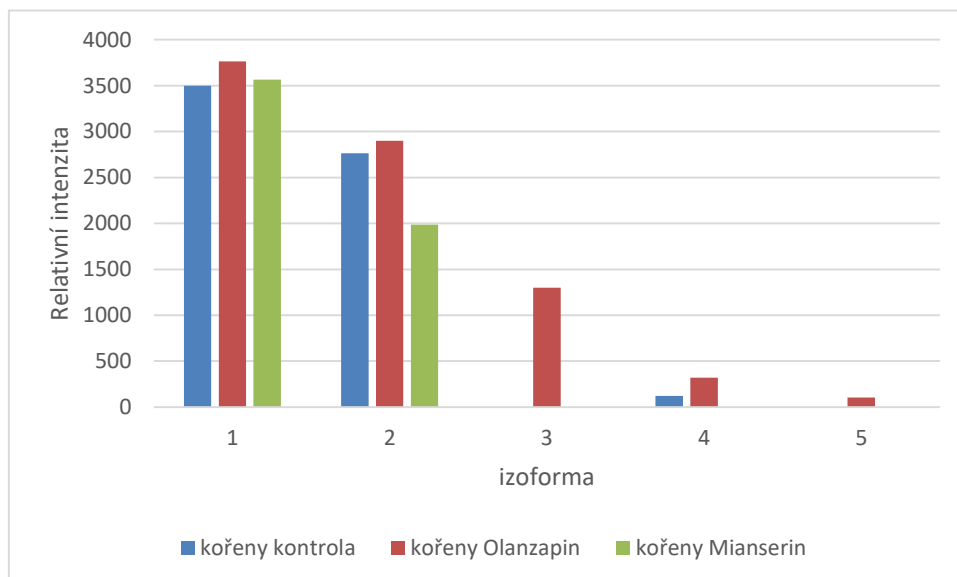
5.5.6 Detekce aktivity izoform enzymů po elektroforetické separaci za nativních podmínek

Po skončení nativní elektroforetické separace a po vložení gelů do detekčních roztoků byla vyhodnocena aktivita jednotlivých izoform. Izoformy volných peroxidáz byly nalezeny pouze v kořenech, v listech byla aktivita izoform peroxidáz pod limitem detekce.

5.5.6.1 Aktivita a izoformy volných peroxidáz



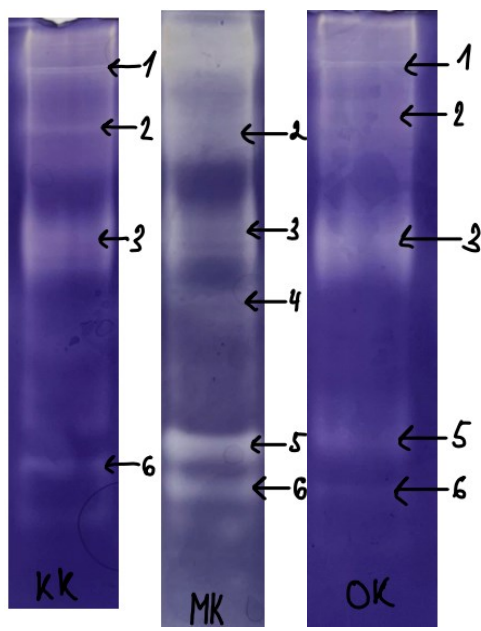
Obrázek 8: Detekované izoformy peroxidáz v kořenech po elektroforetické separaci za nativních podmínek. K-kontrola bez léčiva, O-kontaminace olanzapinem, M-kontaminace mianserinem



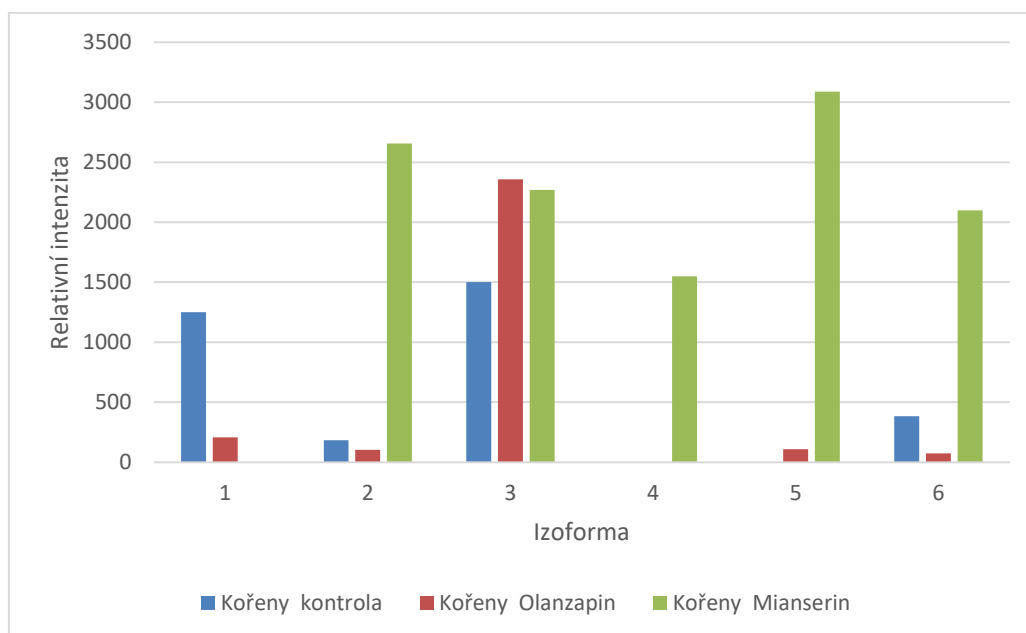
Graf 8: Zastoupení jednotlivých izoform peroxidáz v kořenech rostliny závislosti na jejich relativní intenzitě. Čísla izoform odpovídají detekovaným izoformám na fotografii daného gelu. Relativní intenzita z fotografie gelu byla vyhodnocena v programu GelAnalyzer.

Tmavé proužky na elektroforeogramu znázorňují, že v každé ze tří pozorovaných rostlin se nacházejí minimálně dvě izoformy peroxidáz. Největší intenzitu, tedy i největší aktivitu vykazovaly listy rostlin pěstovaných s olanzapinem v médiu, kde se navíc ukázaly další dvě izoformy oproti kontrolní skupině. Naopak nejnižší intenzitu, tedy aktivitu měly vzorky listů rostlin kontaminovaných mianserinem.

5.5.6.2 Aktivita a izoformy glutathiontransferázy

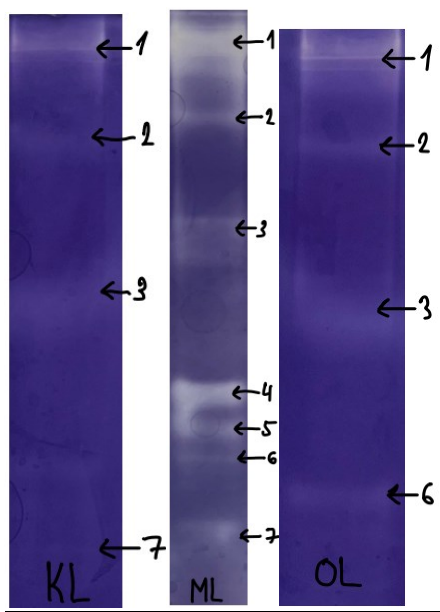


Obrázek 9: Detekované izoformy glutathiontransferázy v kořenech po elektroforetické separaci za nativních podmínek. K-kontrola bez léčiva, O-kontaminace olanzapinem, M-kontaminace mianserine

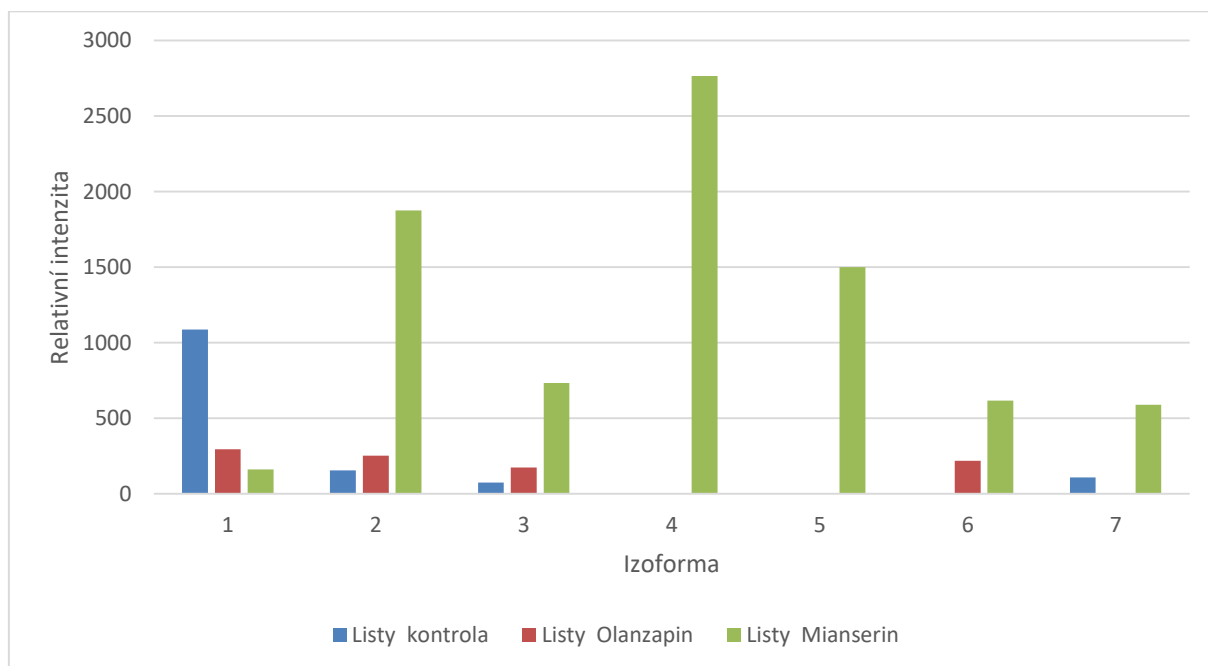


Graf 9: Zastoupení jednotlivých izoform glutathiontransferázy v kořenech rostliny v závislosti na jejich relativní intenzitě. Čísla izoform odpovídají detekovaným izoformám na fotografii daného gelu. Relativní intenzita z fotografie gelu byla vyhodnocena v programu GelAnalyzer.

Z grafu číslo 8 je patrné, že největší intenzitu tedy i největší aktivitu vykazují kořeny rostlin kontaminovaných mianserinem, kde se objevily další dvě izoformy, které nebyly detekované v kontrolní skupině. Kořeny kontrolních rostlin obsahují čtyři izoformy glutathiontransferázy s poměrně malou relativní intenzitou s výjimkou třetí izoformy. Kořeny rostlin obsahující olanzapin v médiu obsahují pět izoform, ze kterých vyazuje největší intenzitu izoforma s šipkou 3.



Obrázek 10: Detekované izoformy glutathiontransferázy v listech po elektroforetické separaci za nativních podmínek. K-kontrola bez léčiva, O-kontaminace olanzapinem, M-kontaminace mianserinem



Graf 10: Zastoupení jednotlivých izoforem glutathiontrancsferázy v listech rostliny v závislosti na jejich relativní intenzitě. Čísla izoforem odpovídají detekovaným izoformám na fotografii daného gelu. Relativní intenzita z fotografie gelu byla vyhodnocena v programu GelAnalyzer.

V listech byla obecně detekována menší aktivita, než v kořenech (viz graf 8 a graf 9). Listy rostlin kontaminovaných mianserinem v médiu však opět vykazují nejvyšší aktivitu a nejvíce detekovaných izoforem glutathiontransferázy. Kontrolní skupina obsahuje čtyři izoformy s poměrně malou intenzitou, kromě první izoformy, kde intenzita přesáhne hodnotu 1000

(graf 9). V listech rostlin kontaminovaných olanzapinem lze pozorovat také čtyři izoformy s velmi nízkou intenzitou.

6 Diskuze

Při srovnání fytoextrakce mianserinu a olanzapinu byly pozorovány významné rozdíly v jejich poklesu a chování. U mianserinu v prvních 24 hodinách došlo k prudkému poklesu

koncentrace o 50 %, Po pěti dnech se koncentrace zvýšila, pravděpodobně kvůli zpětnému uvolnění léčiva z kořenů v souvislosti s jejich rozkladem. U olanzapinu během prvních 24 hodin došlo k dramatickému poklesu koncentrace téměř o 95 %.

Oba léky vykazovaly rychlý pokles koncentrace v prvních 24 hodinách, avšak pokles koncentrace olanzapinu byl mnohem výraznější než u mianserinu. Zatímco mianserin vykazoval určitý nárůst koncentrace po pěti dnech, což naznačuje zpětné uvolnění z kořenů, koncentrace olanzapinu stabilně klesala bez takového nárůstu. Tyto rozdíly mohou být důsledkem odlišné chemické povahy léčiv a jejich interakcí s rostlinnými kořeny a kultivačním médiem. Fytoextrakce mianserinu byla úspěšně pozorována za využití hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*). V současné době neexistuje mnoho článků o fytoextrakci¹⁸ olanzapinu, avšak mikrořasy (*Nannochloropsis* sp.) byly schopné snížit jeho koncentraci v médiu.³⁷

V rámci srovnání biochemické analýzy metabolismu rostlin v přítomnosti mianserinu a olanzapinu byly pozorovány rozdíly v aktivitě ABTS-peroxidázy, guajakolperoxidázy a volných a membránově vázaných peroxidáz. Výsledky ukazují zvýšenou aktivitu všech typů peroxidáz v kořenech rostlin kontaminovaných oběma léčivy, avšak v případě olanzapinu je aktivita méně výrazná. To naznačuje, že olanzapin vytváří menší stresovou odpověď v rostlinách než mianserin. Aktivita v listech zůstala poměrně konstantní v porovnání s kontrolní skupinou pro obě léčiva. Rostliny reagují na přítomnost mianserinu intenzivněji než na olanzapin, což se projevilo zvýšenou aktivitou peroxidáz. Obecně zvýšení aktivity peroxidáz může souviset se zvýšením lignifikace buněčné stěny a tím pádem snáží prostupnost danému léčivu do rostlinného pletiva.

Po nativní elektroforetické separaci proteinů bylo detekováno, že rostliny kontaminované mianserinem obsahovaly více izoform peroxidáz, tak glutathiontransferázy. V rostlině kontaminované olanzapinem v médiu bylo stanoveno nejvíce izoform peroxidáz v kořenech. Nejvíce izoform bylo nalezeno v listech kontaminovaných rostlin a jednalo se o izoformy glutathiontransferázy. Zvýšení počtu izoform a tedy i aktivity glutathiontransferázy patrně souvisí s biotransformací léčiva (např. konjugací s glutathionem) a jeho následným uložením do rostlinných vakuol.

7 Závěr

- Na základě provedené kultivace rostlin v přítomnosti tetracyklického antidepresiva mianserinu po dobu 168 hodin bylo zjištěno, že celková koncentrace mianserinu v médiu klesla ze 100% na 7%, čili z 2,06 mg/l na 0,14 mg/l. Na základě provedené kultivace rostlin v přítomnosti atypického antipsychotika olanzapinu po dobu 96 hodin bylo zjištěno, že celková koncentrace olanzapinu v médiu rapidně klesla ze 100% pod 1%, čili z 4,9 mg/l na 0,05 mg/l. Rostliny jsou schopny extrahovat léčivo z média a dochází k určité translokaci i do nadzemních částí rostlin v případě olanzapinu. V případě mianserinu se nepodařilo prokázat translokaci do nadzemních částí rostliny, byť jeho přítomnost je i v nadzemní části pravděpodobná, protože došlo k ovlivnění biochemických parametrů.
- Bylo stanoveno množství proteinů dle Bradforda. Nejvíce bílkovin obsahoval extrakt z listů rostlin kontaminovaných olanzapinem v médiu.
- Spektrofotometricky byla detekována aktivita volných a membránově vázaných peroxidáz, guajakolperoxidázy a ABTS-peroxidázy. Byla stanovena zvýšená aktivita všech typů peroxidáz v kořenech rostlin kontaminovaných oběma léčivy.
- Byla provedena nativní elektroforetická separace a následná detekce aktivity glutathiontransferázy a peroxidáz, kde byly detekovány další izoformy oproti nekontaminované kontrolní skupině.

Na základě provedených experimentů je možné konstatovat, že rostliny kukuřice vykazaly schopnost záchytu obou studovaných substancí a prokázaly významný fytoimediační potenciál. Záchyt substancí nelze považovat pouze za adsorpční jevy, neboť byly ovlivněny i vybrané biochemické parametry, které naznačují absorpci do rostlinných pletiv. Translokace do nadzemních částí je nesporná v případě kontaminace olanzapinem v médiu, v případě kontaminace mianserinem se jí přímo nepodařilo prokázat na základě extrahovatelných reziduí, nicméně ovlivnění fyziologie rostlin určitou míru translokace naznačuje. Kromě prokázané fytoimediační účinnosti lze tak předpokládat, byť u obou látek v různé míře, i riziko kontaminace potravních řetězců v přírodě zkoumanými psychoaktivními léčivy.

8 Zdroje:

- [1] HOLM, John V.; RUEGGE, Kirsten.; BJERG, Poul L. a CHRISTENSEN, Thomas H. Occurrence and Distribution of Pharmaceutical Organic Compounds in the Groundwater Downgradient of a Landfill (Grindsted, Denmark). Online. *Environmental Science & Technology*. 1995, roč. 29, č. 5, s. 1415-1420. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/es00005a039>.
- [2] CIZMAS, Leslie; SHARMA, Virender K.; GRAY, Cole M. a MCDONALD, Thomas J. Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. Online. *Environmental Chemistry Letters*. 2015, roč. 13, č. 4, s. 381-394. ISSN 1610-3653. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0524-4>.
- [3] LARSSON, D. G. Joakim. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. Online. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014, roč. 369, č. 1656. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0571>.
- [4] THE GUARDIAN. *Antidepressant drug use in UK*. Online. Dostupné z: <https://www.theguardian.com/society/2021/jan/01/covid-antidepressant-use-at-all-time-high-asaccess-to-counselling-in-england-plunges>
- [5] ŠVIHOVEC, Jan; BULTAS, Jan; ANZENBACHER, Pavel; CHLÁDEK, Jaroslav; PŘÍBORSKÝ, Jan et al. (ed.). *Farmakologie*. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
- [6] MAXDORF S.R.O. *Lekarske.slovniky*. Online. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/psychofarmaka-3>.
- [7] FIŠAR, Zdeněk a JIRÁK, Roman. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. Psyché*. Praha: Computer Press, 2001. ISBN 978-80-247-0061-8.
- [8] SEIFERTO VÁ, Dagmar; PRÁŠKO, Ján; HORÁČEK, Jiří a HOSCHL, Cyril. *Postupy v léčbě psychických poruch*. 2.revidované vydání. Praha 2: Medical tribune cz, 2008. ISBN 978-80-87135-10-5.

[9]. KOPEČEK, Miloslav. PRESKRIPCE PSYCHOFARMAK A JEJICH CENY V ČR V LETECH 2003, 2005 A 2008. Online. *Česká a slovenská psychiatrie*. 2010, article 106, s. 119-120. ISSN 1212-0383. Dostupné z: <http://www.cspsychiatr.cz/detail.php?stat=38>.

[10] SIMON, p.e. a WEISS, j.m. Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. Online. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 1988, č. 1 (4), s. 287-295. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2908021/>.

[11] ELLENBOGEN, M. Mood Response to Acute Tryptophan Depletion in Healthy Volunteers: Sex Differences and Temporal Stability. Online. *Neuropsychopharmacology*. Roč. 15, č. 5, s. 465-474. ISSN 0893133X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00056-5).

[12] MOHR, Pavel; KOPEČEK, Miloslav; BRUNOVSKÝ, Martin a PÁLENÍČEK, Tomáš. *Klinická psychofarmakologie*. Praha 4: Maxdorf s.r.o, 2017. ISBN 978-80-7345-546-0.

[13] HÖSCHL, Cyril. Od mechanismu účinku antipsychotik ke klinické praxi aneb malé psychofarmakologické repetitorium [online] Dostupné z: www.hoschl.cz/files/3848_cz_Antipsychotika_Hoschl.pdf

[14] VANĚK, T; SOUDEK, P; PODLIPNÁ, R; PETROVÁ, Š a LANDA, P. *Fytoremediace a možnosti její aplikace*. Praha 1: Středisko společných činností AV ČR, 2017.

[15] STRABLE, Josh a SCANLON, Michael J. Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. Online. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009, roč. 2009, č. 10. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>.

[16] MANSILLA, Pablo S.; BONGIANINO, Nicolás F.; NAZAR, María C. a PÉREZ, Gabriela T. Agronomic and chemical description of open-pollinated varieties of opaque-2 and purple maize (*Zea mays* L.) adapted to semiarid region of Argentina. Online. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2021, roč. 68, č. 6, s. 2351-2366. ISSN 0925-9864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01133-4>.

[17] WUANA, R; OKIEIMEN, F a . Phytoremediation Potential of Maize (*Zea mays* L.). *African Journal of general agriculture*. 2010, č. 6.

[18] KÓZKA, Bartosz; NAŁĘCZ-JAWECKI, Grzegorz; TURŁO, Jadwiga a GIEBUŁTOWICZ, Joanna. Application of *Pleurotus ostreatus* to efficient removal of selected antidepressants and immunosuppressant. Online. *Journal of Environmental Management*. 2020, roč. 273. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111131>

[19] GASSER, G.; PANKRATOV, I.; ELHANANY, S.; WERNER, P.; GUN, J. et al. Field and laboratory studies of the fate and enantiomeric enrichment of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine under aerobic and anaerobic conditions. Online. *Chemosphere*. 2012, roč. 88, č. 1, s. 98-105. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.074>.

[20] STEWART, Adam; WU, Nadine; CACHAT, Jonathan; HART, Peter; GAIKWAD, Siddharth et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. Online. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2011, roč. 35, č. 6, s. 1421-1431. ISSN 02785846. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.035>.

[21] HORIUCHI, Yoko; KIMURA, Reika; KATO, Noriko; FUJII, Takeshi; SEKI, Masako et al. Evolutional study on acetylcholine expression. Online. *Life Sciences*. 2003, roč. 72, č. 15, s. 1745-1756. ISSN 00243205. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02478-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02478-5).

[22] GUNNARSSON, Lina; JAUHAINEN, Alexandra; KRISTIANSOON, Erik; NERMAN, Olle a LARSSON, D. G. Joakim. Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. Online. *Environmental Science & Technology*. 2008, roč. 42, č. 15, s. 5807-5813. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/es8005173>.

[23] CARTER, Laura J.; WILLIAMS, Mike; MARTIN, Sheridan; KAMALUDEEN, Sara P.B. a KOOKANA, Rai S. Sorption, plant uptake and metabolism of benzodiazepines.

Online. *Science of The Total Environment*. 2018, roč. 628-629, s. 18-25. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.337>.

[24] LI, Yi; MIAO, Yuanyuan; ZHANG, Wenlong; YANG, Nan; NIU, Lihua et al. Sertraline inhibits top-down forces (predation) in microbial food web and promotes nitrification in sediment. Online. *Environmental Pollution*. 2020, roč. 267. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115580>.

[25] TURLEJSKI, Krzysztof. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. Online. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 1996, roč. 56, č. 2, s. 619-636. ISSN 1689-0035. Dostupné z: <https://doi.org/10.55782/ane-1996-1167>.

[26] MUDGAL, Shailendra; ARIANNA, De Toni; LOCKWOOD, Sarah; SALÉS, Katherine; BACKHAUS, Thomas et al. Study on the environmental risks of medicinal products. Online. *Bio intelligence service*. Roč. 2013. Dostupné z: https://health.ec.europa.eu/document/download/592edea4-27d9-4b36-933a-6009057960c1_en.

[27] LERTXUNDI, Unax; HERNÁNDEZ, Rafael; MEDRANO, Juan a ORIVE, Gorka. Drug pollution and pharmacotherapy in psychiatry: A “platypus” in the room. Online. *European Psychiatry*. 2020, roč. 63, č. 1. ISSN 0924-9338. Dostupné z: <https://doi.org/10.1192/j.eurpsy.2020.32>.

[28] KAUSHIK, Gaurav a THOMAS, Michael A. The potential association of psychoactive pharmaceuticals in the environment with human neurological disorders. Online. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2019, roč. 13. ISSN 23525541. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100148>.

[29] NOCTOR, Graham a FOYER, Christine H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. Online. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998, roč. 49, č. 1, s. 249-279. ISSN 1040-2519. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>.

- [30] MATAMOROS, Manuel A.; DALTON, David A.; RAMOS, Javier; CLEMENTE, Maria R.; RUBIO, Maria C. et al. Biochemistry and Molecular Biology of Antioxidants in the Rhizobia-Legume Symbiosis . Online. *Plant Physiology*. 2003, roč. 133, č. 2, s. 499-509. ISSN 1532-2548. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.103.025619>.
- [31] ANJUM, Naser A.; CHAN, Ming-Tsair a UMAR, Shahid (ed.). *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Online. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. ISBN 978-90-481-9403-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9>.
- [32] RAJPUT, Vishnu D.; HARISH; SINGH, Rupesh Kumar; VERMA, Krishan K.; SHARMA, Lav et al. Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. Online. *Biology*. 2021, roč. 10, č. 4. ISSN 2079-7737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology10040267>.
- [33] JEBARA, Salwa; JEBARA, Moez; LIMAM, Férid a AOUBANI, Mohamed Elarbi. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. Online. *Journal of Plant Physiology*. 2005, roč. 162, č. 8, s. 929-936. ISSN 01761617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.10.005>.
- [34] MIKA, Angela a LÜTHJE, Sabine. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. Online. *Plant Physiology*. 2003, roč. 132, č. 3, s. 1489-1498. ISSN 1532-2548. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.103.020396>.
- [35] VAN DOORN, Wouter G. a KETSA, Saichol. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. Online. *Postharvest Biology and Technology*. 2014, roč. 95, s. 64-69. ISSN 09255214. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.04.002>.
- [36] PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C. a DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Online. *Plant Cell Reports*. 2005, roč. 24, č. 5, s. 255-265. ISSN 0721-7714. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>.
- [37] ENCARNACÃO, Telma; PALITO, Cátia; PAIS, Alberto A. C. C.; VALENTE, Artur J. M. a BURROWS, Hugh D. Removal of Pharmaceuticals from Water by Free and Immobilised

Microalgae. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25163639>.