

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VLIV ANTHELMINTIK NA AKTIVITU VYBRANÝCH
BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ U ROSTLIN**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Markéta Hanulíková

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

Datum:

Podpis:

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Tomášovi Vaňkovi, CSc. za umožnění práce v Laboratoři rostlinných biotechnologií na Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR v Praze.

Děkuji RNDr. Lucii Raisové Stuchlíkové, Ph.D. a RNDr. Radce Podlipné, Ph.D. za pomoc, cenné rady a věnovaný čas v řešení postupů a vyhodnocování výsledků při vypracování mé diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Markéta Hanulíková

Školitel: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv anthelmintik na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů

Anthelmintika patří mezi léčiva hojně využívaná ve veterinární medicíně. V prostředí tyto léčiva představují významný zdroj znečištění s negativním dopadem na mikroorganismy i celé ekosystémy. Osud anthelmintik a jejich účinky na rostliny nebyly doposud dostatečně prostudovány. Cílem této práce bylo zjistit působení dvou často používaných anthelmintik fenbendazolu (FEN) a ivermektinu (IVM) na antioxidantní enzymy peroxidasu (POX), katalasu (CAT), askorbát peroxidasu (APX), glutathion reduktasu (GR), glutathion-S-transferasu (GST) a superoxid dismutasu (SOD) u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Studie byla prováděna na *in vitro* buněčných suspenzích *Arabidopsis thaliana*. Aktivita enzymů byla měřena spektrofotometricky u vzorků odebraných po 8, 24 a 72 hodinách. U vzorků vystavených působení vlivu FEN se aktivita enzymu SOD zvýšila a naopak u GST došlo ke snížení aktivity enzymu. Přítomnost IVM má na aktivitu GR, GST a SOD inhibiční účinek, naopak u POX a CAT dochází k nárůstu aktivity. Aktivita enzymu APX není u IVM ani FEN po celou dobu expozice signifikantně ovlivněna. Výsledky ukázaly, že obě použítá anthelmintika mohou ovlivnit aktivitu antioxidantních enzymů, což může vést k vyššímu riziku oxidačního poškození rostliny.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Markéta Hanulíková

Supervisor: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Consultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of anthelmintics on activity of selected biotransformation enzymes

Anthelmintics belong between the drugs widely used in veterinary medicine. In the environment, these drugs represent a significant source of pollution with a negative impact on micro-organism and entire ecosystems. The fate of anthelmintics and their effect on plants has not yet been studied sufficiently. The aim of this work was to investigate the effect of two frequently used anthelmintics, fenbendazole (FEN) and ivermectin (IVM) on antioxidant enzymes peroxidase (POX), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) in model plant *Arabidopsis thaliana*. In this study was used *in vitro* cell suspension of *Arabidopsis thaliana*. Enzyme activity was measured spectrophotometrically in samples taken after 8, 24 and 72 hours. At samples exposed to effect of FEN the activity of SOD enzyme increased, on the other hand the activity of GST enzyme decreased. The presence of IVM has an inhibitory effect on GR, GST and SOD activity, on the other hand activity of CAT and POX increased. Enzymatic activity of APX is not significantly affected by IVM or FEN throughout the exposure period. Results have shown that both anthelmintics can affect the activity of antioxidant enzymes, which can lead to higher risk of oxidative damage in plant.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Problém znečištění ekosystému léčivy.....	9
2.1.1	Veterinární léčiva v životním prostředí	10
2.2	Osud xenobiotika v rostlinách.....	11
2.2.1	I.fáze biotransformace	11
2.2.2	II. fáze biotransformace	13
2.2.3	Oxidační stres v rostlinách.....	14
2.3	Vybrané antioxidační enzymy.....	16
2.3.1	Peroxidasa	16
2.3.2	Katalasa.....	17
2.3.3	Askorbát peroxidasa	19
2.3.4	Glutathion reductasa	19
2.3.5	Glutathion-S-transferasa	20
2.3.6	Superoxid dismutasa	21
2.4	Anthelmintika.....	22
2.4.1	Benzimidazolová anthelmintika	23
2.4.2	Makrocyclické laktony	25
2.4.3	Rezistence na anthelmintika	26
2.5	Fytoremediace	27
2.5.1	Fytoremediační techniky.....	28
2.6	Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	30
3	Cíl práce.....	32
4	Experimentální část.....	33
4.1	Modelový systém	33
4.2	Použité chemikálie a reagentie	33
4.3	Příprava roztoků	34
4.3.1	Živné medium V ₄	34
4.3.2	Extrakční pufr	34
4.4	Použité přístroje	35
4.5	Metodika	35
4.5.1	Kultivace buněk <i>in vitro</i>	35

4.5.2	Odběr a příprava rostlinného materiálu	35
4.5.3	Stanovení bílkoviny	36
4.5.4	Peroxidasa	36
4.5.5	Katalasa	37
4.5.6	Askorbát peroxidasa	37
4.5.7	Glutathionreduktasa	38
4.5.8	Glutathion-S-transferasa	39
4.5.9	Superoxid dismutasa	39
4.5.10	Statistická analýza	40
5	Výsledky	41
5.1	Stanovení bílkoviny	41
5.2	Peroxidasa	42
5.3	Katalasa	43
5.4	Askorbát peroxidasa	44
5.5	Glutathionreduktasa	45
5.6	Glutathion-S-transferasa	46
5.7	Superoxid dismutasa	47
6	Diskuze	48
7	Závěr	50
8	Seznam zkratk	51
9	Použitá literatura	52

1 Úvod

Anthelmintika patří do skupiny léčiv hojně se využívající ve veterinární medicíně k léčbě a prevenci onemocnění způsobené červy. Nicméně anthelmintika nejsou často v organismu zvířete plně metabolizována a rezidua léků se prostřednictvím moče a trusu dostávají do životního prostředí (Cooke, et al., 2017), kde mohou mít negativní vliv na mikroorganismy. Proto je jejich výskyt v ekosystému neustále sledován. Chybí však znalosti týkající se množství léčivých látek vstupujících do prostředí, informace o jejich metabolických a transformačních cestách, účincích aktivních složek léčiv, metabolitů a produktů transformace na organismy, ale i o jejich perzistenci a rozložitelnosti v prostředí (Klatte, et al., 2017). Díky pokročilejším metodám už lze detekovat mnohem nižší koncentrace znečišťujících látek v životním prostředí než dříve (Sosa-Ferrera, et al., 2013).

Mnoho xenobiotik vstupuje i do rostlin a představují pro ně potenciální nebezpečí. Pokud jsou rostliny vystaveny stresovým podmínkám prostředí, vzrůstá produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), což může vést k významnému poškození jejich buněk. Z tohoto důvodu si rostliny vyvinuly extrémně sofistikované detoxifikační mechanismy včetně enzymů metabolizujících xenobiotika (Bártíková, et al., 2015; Caverzan, et al., 2012)

Tato práce se zabývala vlivem léčiv ze skupiny anthelmintik na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*.

2 Teoretická část

2.1 Problém znečištění ekosystému léčivy

Humánní a veterinární léčivé přípravky patří spolu s přípravky pro osobní hygienu, pesticidy, herbicidy a průmyslovými sloučeninami mezi tzv. „nové“ environmentální kontaminanty, o nichž se předpokládá, že mají dlouhodobý nepříznivý účinek na ekosystém (Bártíková, et al., 2015).

Distribuce farmak do životního prostředí se poněkud liší v porovnání s tradičními polutanty. Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti nebo ženy užívající hormonální antikoncepci. Aktivní látky jsou z těla vylučovány buď v nezměněné podobě, nebo ve formě jejich metabolitů. Za další významný zdroj jsou považovány léky s proslulou trvanlivostí, které se do koloběhu dostávají buď formou průsaků ze skládek nebo v důsledku jejich nevhodné likvidace prostřednictvím odpadu (Kotyza, et al., 2009). Farmaceutika se pak dostává do vodních toků, protože jsou nedostatečně odstraněny běžnou úpravou odpadních vod. Následně se mohou léčiva a jejich metabolity dostávat do podzemních vod, i když v mnohem nižších koncentracích. Sporadicky se může stopové množství léčiv najít dokonce i v pitné vodě. Ke kontaminaci půdy dochází zejména hnojením zemědělské půdy. Zde jsou významným zdrojem znečištění zejména veterinární léčiva. V menší míře se léčiva do prostředí mohou dostat také vzduchem. Bylo prokázáno, že v chovných zařízeních, kde jsou veterinární léčiva podávána jako prášek, může dojít k jejich rozptýlu ve vzduchu a spolu s prachem jsou pak odváděny vzduchotechnikou do okolního prostředí (Klatte, et al., 2017).

Léčiva poté mohou negativně ovlivňovat živé organismy, včetně rostlin. Z tohoto důvodu si rostliny vyvinuly sofistikované detoxifikační systémy (Bártíková, et al., 2015). Podle koncentrace léčiv, která se dostane do organismu, se efekt jakým léčiva působí na organismus, dělí do třech skupin. První skupina zahrnuje normální toxické účinky typické pro všechny xenobiotika. Tyto účinky mohou působit jak na buněčné úrovni, tak i na celý ekosystém. Druhá skupina zahrnuje účinky na organismus připisované antibiotikům, zejména vznik rezistence a selekci více škodlivých bakterií. Účinky třetí skupiny zahrnují tzv. endokrinní disruptory, které i ve velmi nízkých koncentracích mohou narušit normální funkci hormonů (Bártíková, et al., 2016).

Výskyt více jak 600 aktivních látek, jejich metabolitů nebo produktů transformace byl prozatím v prostředí detekován v 71 zemích světa (Klatte, et al., 2017). Z léčiv používaných se v humánní medicíně se v prostředí vyskytují zejména antibiotika, analgetika, léky užívané se u kardiovaskulárních onemocnění (β – blokátory, diuretika), psychostimulancia, antiepileptika a hormonální léčiva. Z veterinárních léčiv se v prostředí nejčastěji vyskytují antibiotika, hormony a antiparazitika (Li, 2014).

2.1.1 Veterinární léčiva v životním prostředí

Veterinární léčivé přípravky jsou, stejně jako jiná léčiva, potenciální skupinou chemických kontaminantů. Zahrnují nejen původní formu účinné látky nebo její prekurzor, ale také její aktivní metabolity a transformační produkty. Kromě látek používaných k léčbě a prevenci onemocnění se u zvířat používají jako přísady do krmiv i další chemické látky (např. růstové promotory). V dnešní době je využíváno celé spektrum veterinárních léčiv, nicméně mezi nejpoužívanější se řadí antibiotika, antiparazitika a hormonální léčiva. Ve 25 zemích EU je za rok spotřebováno přibližně 5393 tun antibiotik, 194 tun antiparazitik a 4,6 tun hormonů (Bártíková, et al., 2016).

Veterinární léčiva se do prostředí dostávají různými cestami v závislosti na způsobu podání, typu léčby a typu léčeného zvířete. Mezi hlavní zdroje znečištění patří chovy ryb a chovy hospodářských zvířat. Méně významnými zdroji znečištění jsou domácí zvířata, polutanty unikající do prostředí během výroby nebo nevhodné likvidace nepoužitelných léčiv (Boxall, et al., 2002). Šíření veterinárních léčiv do prostředí je mnohem více komplexnější, než u léčiv používaných v humánní medicíně. Emise léčiv může probíhat přímou nebo nepřímou cestou. Přímou cestou se rozumí např. užívání léčiv u zvířat chovaných na pastvinách, kdy jsou rezidua léků přímo vylučována do prostředí. Nepřímá cesta je například použití hnoje z ošetřených zvířat na hnojení půdy. V tomto případě nevznikají metabolity léčiv pouze u zvířat, ale mohou vznikat a dále se rozkládat i během skladování. Doba setrvávání léčiv v hnoji může být od dnů až po měsíce. Složky léčiv perzistujících v prostředí pak mohou negativně ovlivňovat jak vodní tak i suchozemské ekosystémy (Derksen, et al., 2004; Bártíková, et al., 2015)

K dispozici jsou pouze omezené zdroje týkající se osudu léčiv v prostředí a jen několik z nich se zabývá osudem anthelmintik v prostředí, který je do značné míry ovlivněn jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi. V prostředí se anthelmintika

nevyskytují jako jednotlivé kontaminanty, ale spíše jako složité směsi s dalšími léčivy a polutanty. U parazitů, kteří jsou vystaveni působení nízkých koncentrací léčiv v prostředí, může dojít k rozvoji rezistence (Horvat, et al., 2012).

2.2 Osud xenobiotika v rostlinách

Osud organických xenobiotik v rostlinách popisuje koncept podle Sandermann, (1994) nazvaný „*The green liver*“. Koncept popisuje určitou podobnost v metabolismu organických sloučenin u živočichů a rostlin. Procesy, které jsou srovnatelné jak u živočichů, tak i u rostlin, zahrnují: (1) schopnost metabolizovat a detoxifikovat xenobiotika, (2) přítomnost specifických metabolických drah a biotransformačních enzymů, (3) přeměnu lipofilních xenobiotik na hydrofilní sloučeniny pro lepší transport a vylučování (Pflugmacher, et al., 2015).

Biotransformace je jedním z důležitých obranných mechanismů rostliny regulovaný rozličnými enzymy ve třech fázích: (1) transformace, během které molekula získává hydrofilní funkční skupinu nebo dochází k jejímu odkrytí, (2) konjugace xenobiotika s molekulami vlastní rostlině (např. sacharidů, peptidů, organických kyselin) a (3) kompartmentace, kdy dochází k uskladnění konjugátů ve vakuolách, apoplastech nebo buněčné stěně. Někdy bývá rozlišována ještě čtvrtá fáze biotransformace, během které dochází k dalším přeměnám uskladněných konjugátů xenobiotik (Boušová, et al., 2013).

U rostlin v přítomnosti xenobiotika dochází ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů, které mohou vést k poškození buňky, ale také je to signál k aktivaci obranných mechanismů. Jako odpověď na zvýšenou tvorbu volných radikálů rostliny aktivují antioxidační obranné mechanismy zahrnující antioxidační enzymy a neenzymové antioxidy (Gill, et al., 2010). Aktivace antioxidačních obranných systémů přispívá k lepší toleranci rostliny na stresové faktory a tím také ovlivňuje účinnost fytořemediace (Komives, et al., 2005).

2.2.1 I. fáze biotransformace

I. fáze biotransformace zahrnuje oxidační, hydrolytické a redukční reakce. Výsledkem těchto reakcí jsou více polární, ve vodě lépe rozpustné metabolity, které jsou obvykle i chemicky a biologicky aktivnější oproti výchozí sloučenině. Hydrolytickým reakcím v rostlinách podléhají kontaminanty obsahující ve své struktuře amidovou nebo

esterovou skupinu. Reakce jsou katalyzované enzymy ze skupin amidas, esteras nebo proteas. Produktem hydrolytické reakce je sloučenina s volnou karboxylovou skupinou. Nejčastější reakcí I. fáze je oxidace. Oxidační reakce jsou katalyzované enzymy cytochromu P450 (Komives, et al., 2005). Mezi oxidační reakce se řadí hydroxylace, dealkylace, oxidační deaminace, oxidační dehalogenace, oxidace alkoholů a aldehydů, N-oxidace a S-oxidace. Z kvantitativního hlediska jsou redukční reakce méně významné než oxidační, ale pro určité strukturní typy xenobiotik jsou hlavní metabolickou cestou (Boušová, et al., 2013).

2.2.1.1 Enzymy I. fáze biotransformace

Cytochromy P450 jsou nejdůležitější enzymy I. fáze biotransformace, které se podílejí na metabolismu xenobiotik. Strukturně se jedná o hemoproteiny vyskytující se u všech živých organismů. CYP katalyzují štěpení O – O vazby molekuly kyslíku a vazbu atomu kyslíku na inaktivní uhlovodíkovou sloučeninu. Tato reakce je důležitá jak pro syntézu endogenních sloučenin (např. mastné kyseliny, steroidní hormony), tak i k detoxifikaci xenobiotik (Hamdane, et al., 2008). CYP obvykle katalyzují monooxygenaci substrátů, ale jsou také schopny působit jako peroxidasy nebo reduktázy (Bártíková, et al., 2015).

Peroxidasy jsou skupinou hemoproteinů, které katalyzují redoxní reakci mezi peroxidem vodíku a substrátem. Vyskytují se u rostlin, živočichů i mikroorganismů. Peroxidasy jsou zapojeny do řady buněčných procesů, jako je reakce na stres nebo se uplatňují při vývoji. Na základě rozdílů v primární struktuře se peroxidasy rozdělují do tří tříd. První třída, také známá jako askorbát peroxidasy, zahrnuje intracelulární enzymy vyskytující se u rostlin, hub a kvasinek. Druhou třídou jsou extracelulární peroxidasy vyskytující se u hub a třetí třídu představují klasické peroxidasy vyskytující se u vyšších rostlin (Jouili, et al., 2011).

Alkoholdehydrogenasy (ADHs) a **aldehyddehydrogenasy (ALDHs)** jsou enzymy významně zastoupené především u živočichů, u rostlin jsou zastoupené v menší míře. Enzymy katalyzují oxidaci xenobiotických i eobiotických alkoholů a aldehydů a v rostlinách se podílejí na produkci charakteristických vůní lákající opylovače a chránící rostliny proti býložravcům (Strommer, 2011). ALDHs jsou, na rozdíl od ADHs, mnohem důležitější v metabolismu xenobiotik. Enzymy se podílejí na konverzi aldehydů na příslušné karboxylové kyseliny. Nedávné studie ukázaly, že

aldehyddehydrogenasy jsou slibnou třídou enzymů pro zlepšení vývoje růstu rostliny, skladování semen a odolnosti vyšších rostlin vůči stresu z prostředí (Bártíková, et al., 2015).

Dehydrogenasy/reduktasy jsou enzymy, které mohou katalyzovat přeměnu nejen xenobiotik, ale i řadu endogenních molekul. Často jsou činností těchto enzymů metabolizovány aldehydy a ketony. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDRs) jsou jednou z největších a nejstarších NAD(P)(H) depedentních nadrodin enzymů, které vykazují nízkou sekvenční podobnost. Tyto enzymy jsou zapojeny do cest sekundárního metabolismu (terpenoidy, alkaloidy, fenolické sloučeniny) nebo se podílí na vývojových procesech (biosyntéza hormonů, vývoj květu) (Bártíková, et al., 2015).

Aldo-keto reduktasy (AKRs) jsou nadrodinou enzymů, jejíž členové jsou zapojeni do metabolismu aldehydů a ketonů (Bártíková, et al., 2015). Rostlinné AKRs lze rozlišit do čtyř důležitých funkčních skupin, které zdůrazňují jejich rozmanité funkce v rostlině. Podílejí se například na detoxifikaci aldehydu, biosyntéze osmolytu, sekundárním metabolismu nebo na membránovém transportu (Sengupta, et al., 2015). Navíc hrají AKRs důležitou roli v ochraně rostliny před osmotickým stresem a toleranci mrazu (Eva, et al., 2014).

Karboxylesterasy katalyzují hydrolýzu esterů, čímž je odhalena funkční skupina, která následně podstupuje další chemickou modifikaci. Tím se radikálně mění biologická aktivita původní sloučeniny. U mnoha různých druhů rostlin se karboxylesterasy podílejí na metabolismu xenobiotik (Bártíková, et al., 2015).

Epoxidhydrolasy jsou další skupinou enzymů, u nichž byla zjištěna aktivita vůči xenobiotickým substrátům (Bártíková, et al., 2015).

2.2.2 II. fáze biotransformace

Do II. fáze biotransformace řadíme konjugační reakce, při kterých xenobiotikum či metabolit vzniklý během I. fáze biotransformace reaguje s endogenní sloučeninou. Tato endogenní sloučenina většinou obsahuje ionizovatelné skupiny. Konjugace vyžaduje dodání energie. Konjugáty vzniklé vazbou xenobiotika s konjugačním činidlem jsou většinou méně biologicky aktivní a hydrofilnější než původní xenobiotikum (Boušová, et al., 2013). Mezi konjugační reakce patří glukuronidace, sulfatace, methylace, acetylace, konjugace s glutathionem (GSH) a aminokyselinami (Jancova, et al., 2010).

2.2.2.1 Enzymy II. fáze biotransformace

UDP-glykosyltransferasy (UGTs) jsou velmi rozšířené detoxifikační enzymy. Katalyzují přenos glykosylové skupiny na malou hydrofilní molekulu (aglykon). Mezi látky podléhající glykosylaci patří jak látky eobiotické (např. rostlinné hormony, sekundární metabolity), tak i xenobiotika. Glykosylace ovlivňuje mnoho vlastností aglykonu jako je rozpustnost, bioaktivitu a transport uvnitř buňky i v celé rostlině (Bártíková, et al., 2015).

Sulfottransferasy (STs) jsou enzymy katalyzující konjugaci 3' - fosfoadenosin – 5'- fosfosulfátem (PAPS). Sulfonaci podléhají zejména alkoholy, fenoly a aminy (Boušová, et al., 2013). Důležitou charakteristikou těchto enzymů je histidinový zbytek v aktivním místě a definované vazebné místo pro PAPS. V rostlinách se sulfatace podílí na rozpoznávacích a signalizačních procesech a zdá se, že hraje důležitou roli v růstu a vývoji rostliny a přizpůsobení se stresovým podmínkám. Mezi substráty v rostlině patří glukosinoláty, brassinosteroidy, jasmonáty, flavonidy a kyselina salicylová (Bártíková, et al., 2015).

Glutathion-S-transferasy (GSTs) jsou typické enzymy II. fáze biotransformace. Jedná se o širokou skupinu enzymů, které katalyzují konjugaci různých substrátů s GSH. Jejich hlavní úloha je v detoxikaci xenobiotik, ale u rostlin se podílejí i na regulaci růstu a vývoje (Dixon, et al., 2010).

S-adenosyl-L-methionin dependentní **metyltransferasy** (MTs) jsou nejčastějšími enzymy katalyzující přenos methylové skupiny na jinou chemickou sloučeninu. Tyto reakce jsou běžné při biosyntéze přírodních produktů, méně často se vyskytují u xenobiotik. MTs jsou zodpovědné za modifikaci široké řady strukturně odlišných substrátů (např. signální sloučeniny, pigmenty, kofaktory) (Bártíková, et al., 2015).

2.2.3 Oxidační stres v rostlinách

Kyslík je nedílnou součástí života na zemi. Běžný molekulární kyslík vyskytující se v atmosféře je poměrně málo reaktivní (Scandalio, 1993), avšak jeho aktivace nebo redukce vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) zahrnujících singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), perhydroxylový radikál ($\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a hydroxylový ion (OH^-) (Tripathy, et al., 2012; Piterková, et al., 2005).

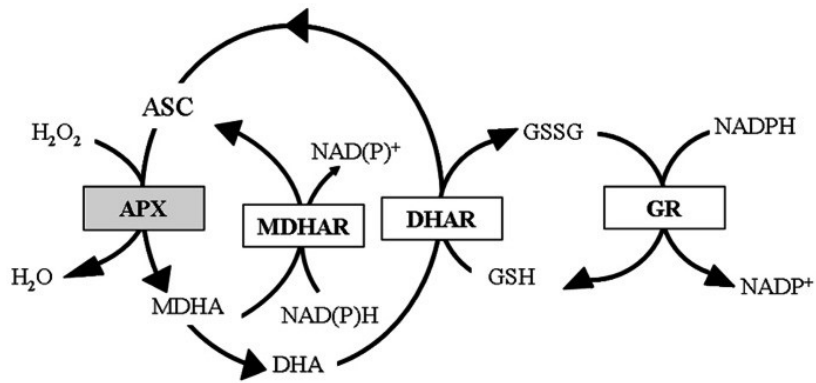
ROS jsou přirozeně produkovány rostlinami, ale i dalšími živými organismy prostřednictvím metabolických pochodů (Tripathy, et al., 2012). Hlavní zdroj ROS u rostlin představuje převážně Mehlerova reakce probíhající v chloroplastech, fotorespirace v peroxisomech a elektronový transport v mitochondriích. Dalším významným zdrojem ROS v rostlině jsou detoxifikační reakce katalyzované cytochromem P450 v cytoplasmě a endoplasmatickém retikulu. V menší míře jsou ROS produkovány v plasmatické membráně, buněčné stěně a apoplastech (Gill, et al., 2010).

Vznik ROS v rostlinách je nicméně indukován i vlivem nejružnějších stresových podmínek prostředí. Rostliny mají proti ROS dobře vyvinutý obranný mechanismus zahrnující jak omezení tvorby ROS, tak i jejich odstranění. Za nestresových podmínek je tvorba a odstraňování v rovnováze (Alscher, et al., 2002). Vlivem působení stresových faktorů může být obranný systém buňky za zvýšené produkce ROS přetížen, což může vést k oxidačnímu poškození DNA, proteinů, lipidů a nakonec i k buněčné smrti (Tripathy, et al., 2012). Spouštěcí faktory můžeme rozlišit na biotické (viry, bakterie) a abiotické (extrémní teplotní podmínky, salinita, nedostatek živin, chemikálie a jiné polutanty) (Shanke, 2016).

2.2.3.1 Antioxidační mechanismy

Rostliny vyvinuly účinné obranné systémy, které odstraňují ROS a chrání tak buňky proti oxidačnímu poškození. Rovnováha mezi produkcí a odbouráváním je udržována pomocí antioxidantů a antioxidačních enzymů. Antioxidační aktivita je velmi závislá na působení stresových faktorů, stejně jako na druhu, stadiu vývoje a na fyziologickém věku rostliny (Piterková, et al., 2005).

Hlavní cestou odbourávání ROS u rostlin je Askorbát-Glutathionový cyklus (AsA-GSH) probíhající v chloroplastech, mitochondriích, peroxisomech, apoplastech a cytosolu. AsA-GSH cyklus zahrnuje postupnou oxidaci a redukci askorbátu, glutathionu a NADPH katalyzované askorbát peroxidasou (APX), monodehydroaskorbát reduktasou (MDAR), dehydroaskorbát reduktasou (DHAR) a glutathion reduktasou (GR). AsA-GSH cyklus tak hraje důležitou roli v boji proti oxidačnímu stresu vyvolanému stresory z prostředí (Caverzan, et al., 2016).



Obr. 1 Askorbát-Glutathionový cyklus (Locato, et al., 2013)

Neenzymové antioxidanty

Neenzymové antioxidanty se nacházejí ve všech buněčných kompartmentech. Tyto sloučeniny mohou působit přímo při detoxifikaci ROS a radikálů nebo mohou redukovat substráty pro antioxidantní enzymy. Neenzymové složky antioxidantního obranného systému zahrnují zejména buněčné redoxní pufry, askorbát a GSH, ale také tokoferol, karotenoidy a fenolické sloučeniny (Caverzan, et al., 2016).

Antioxidantní enzymy

Obranná reakce buněk pomocí antioxidantních enzymů zahrnuje enzymy schopné odstraňovat, neutralizovat nebo eliminovat ROS (Scandalio, 1993). Mezi antioxidantní enzymy patří SOD, CAT, APX, GR, MDAR, DHAR, glutathion peroxidasa (GPX), guaiakol peroxidasa (GOPX) a GST (Gill, et al., 2010). Obecnou odpovědí na zvýšenou hladinu ROS je i zvýšená hladina antioxidantních enzymů (Dat, et al., 2000).

2.3 Vybrané antioxidantní enzymy

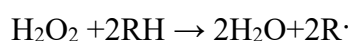
2.3.1 Peroxidasa

Peroxidasa (POX, EC 1.11.1.7) je oxidoredukční enzym typicky se vyskytující u rostlin a patří do III. třídy nadrodiny peroxidas (Hiraga, et al., 2001). Strukturně se jedná o hem obsahující glykoprotein složený přibližně z 300 až 303 aminokyselinových zbytků (Delannoy, et al., 2004) kódovaný velkým množstvím genů (např. POX *Arabidopsis thaliana* je kódován 73 geny, POX *Oryza sativa* 138 geny a POX *Populus trichocarpa* 93 geny) (Shigeto, et al., 2016). Všechny POX mají poměrně stejnou strukturu, jejíž základ tvoří deset α -helixů. POX I. a II. třídy obsahují jeden speciální α -helix. POX III. třídy se od ostatních tříd liší přítomností třech speciálních α -helixů (Hiraga, et al., 2001).

Obecně se nejedná o enzym s vysokou specifičností k určitým substrátům. Některé isoenzymy mohou dokonce katalyzovat oxidoredukci nezávislou na přítomnosti peroxidu vodíku. Nicméně určitou míru specifity vykazují pro fenoly, zejména pro koniferylalkohol (Almagro, et al., 2009). POX se nachází zejména v buněčné stěně a vakuolách (Cosio, et al., 2009), v omezené míře se může nacházet i v mitochondriích čočky (Delannoy, et al., 2004).

POX je významný regulátor extracelulární hladiny peroxidu vodíku, ale také je sama významným producentem ROS (Shkryl, et al., 2013). POX kromě obrany rostliny před buněčným stresem ovlivňuje i řadu fyziologických procesů probíhajících v rostlině, což je nejspíše dáno existencí řady isoform a univerzálností reakce katalyzované tímto enzymem. POX hraje roli v lignifikaci, suberizaci, zesíťování strukturálních proteinů buněčné stěny, katabolismu auxinů, syntéze fytoalexinu (Almagro, et al., 2009) a biosyntéze sekundárních metabolitů (De Gara, 2004).

Různorodé funkce POX jsou dosahovány pomocí dvou následujících mechanismů: (1) oxidací cílové molekuly (prekurzor ligninu, auxin, fenolické sloučeniny, sekundární metabolity) nebo (2) regulací ROS. ROS generované v reakcích katalyzovaných pomocí POX hrají přímo či nepřímo významnou roli na fungování POX. V obvyklém peroxidačním cyklu redukuje POX molekulu peroxid vodíku na vodu za současné oxidace substrátu.



Pokud je substrátem molekula, ze které může vznikat ROS (thiol, kyselina salicylová, NAD(P)(H)), reaguje radikál derivátu s molekulou kyslíku za vzniku superoxidového radikálu (Shigeto, et al., 2016).

2.3.2 Katalasa

Katalasa (CAT; EC 1.11.1.6) je redoxní enzym obsahující hem, který je klíčový pro aktivitu enzymu. Enzym má tetramerní strukturu se čtyřmi identickými monomerními jednotkami. Hemostatická skupina každé monomerní jednotky se skládá z centrálního atomu železa připojeného k protoporfyrinovému kruhu. Na základně velikosti podjednotek, kvartérních struktur, prostetických skupin a sekvencí lze katalasu rozdělit do tří hlavních skupin: (1) monofunkční katalasa, (2) katalasové peroxidasy a (3) katalasy neobsahující hem. Většina rostlin má monofunkční CAT (Sharma, et al., 2014).

Enzymy I. skupiny jsou lokalizovány v listech a jsou zahrnuty do odstraňování peroxidu vodíku během fotorespirace. Enzymy II. skupiny se nacházejí hlavně v cévních svazcích a enzymy III. skupiny odstraňují peroxid vodíku z glyoxysomů a jsou hojně zastoupeny v semenech a mladých semenáčcích (Piterková, et al., 2005).

CAT se vyskytuje u všech aerobních eukaryot zejména v peroxisomech. Kromě peroxisomů se dále nachází v glyoxysomech (Dat, et al., 2000), mitochondriích a cytosolu buněk (Sharma, et al., 2014).

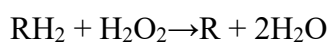
CAT katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík a hraje tak klíčovou roli nejen v metabolismu a obraně rostliny před ROS, ale také při vnímání signálu (Anjum, et al., 2016). Účastní se odstraňování peroxidu vodíku produkovaného v peroxisomech při β -oxidaci mastných kyselin, glyoxilátového cyklu nebo při katabolismu purinů (Piterková, et al., 2005). CAT rovněž katalyzuje přeměnu H_2O_2 vznikajícího během transportu elektronů v mitochondriích a H_2O_2 vznikající při fotorespiraci (Sharma, et al., 2014). Jedná se o jeden z neúčinnějších enzymů vůbec. Jedna molekula enzymu je schopna za minutu přeměnit až 6 milionů molekul H_2O_2 na vodu a kyslík (Gill, et al., 2010).

Antioxidační aktivita katalasy

CAT může katalyzovat rozpad peroxidu vodíku (katalasová aktivita) nebo oxidaci substrátů jako methanol, ethanol, formaldehyd, formát a nitrit peroxidem vodíku (peroxidasová aktivita) (Piterková, et al., 2005).

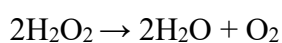
Peroxidasová aktivita

Pokud je koncentrace H_2O_2 nízká ($<10^{-6}$ M), CAT vykazuje peroxidasovou aktivitu.



Katalasová aktivita

Jestliže je koncentrace H_2O_2 vyšší ($>10^{-6}$ M), CAT má katalasovou aktivitu (Anjum, et al., 2016).



2.3.3 Askorbát peroxidasa

Askorbát peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) je enzym patřící do I. třídy nadrodiny rostlinných peroxidas. Enzym ve své struktuře obsahuje hem. Obsah železa je zásadní pro katalytickou aktivitu enzymu, jeho nedostatek snižuje aktivitu APX (Imahori, 2014). APX je typická pro rostliny (Imahori, 2014), ale můžeme ji najít u řas, některých prvoků a výjimečně u mnohobuněčných organismů (Ribeiro, et al., 2017).

APX je důležitou složkou antioxidačního systému, AsA - GSH cyklu, kde využívá askorbát jako specifického donoru elektronů pro redukcí peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Ribeiro, et al., 2017). APX je vysoce citlivá na koncentraci askorbátu. Aktivita rychle ztrácí stabilitu a klesá za podmínek, ve kterých je koncentrace askorbátu nižší jak 20 μM (Imahori, 2014). Jelikož isoformy APX vykazují vyšší hodnotu afinity pro peroxid vodíku než CAT, předpokládá se, že APX se podílí zejména na modulaci hladiny H_2O_2 za fyziologických podmínek a CAT redukuje přebytky H_2O_2 vznikající při oxidativním stresu (Ribeiro, et al., 2017).

APX se nachází v několika buněčných kompartmentech a jsou rozlišovány nejméně čtyři isoformy tohoto enzymu mající různé vlastnosti. Podle jejich subcelulární lokalizace rozlišujeme isoenzymy nacházející se v cytosolu, mitochondriích, ve stromatu a tylakoidech chloroplastů a isoenzymy vázané na membránu v mikrotělískách (glyoxysomy, peroxisomy). Isoformy nacházející se v cytosolu jsou většinou homodimery a u rostlin se v cytosolu nacházejí dva isoenzymy APX. U *Arabidopsis thaliana* je cytosolický APX1 konstitutivně exprimován v mnoha rostlinných tkáních a jeho exprese je významně zvýšena v reakci na biotické a abiotické stresové faktory. Funkce cytosolové APX1 je úzce spojena s ROS signalizačními dráhami v různých buněčných kompartmentech a mohla by být zapojena do regulace hladin ROS v celé buňce. Druhý cytosolový isoenzym APX2 se také podílí na reakci rostliny vůči abiotickému stresu. Jeho exprese je významně zvýšena zejména v kořenech (Imahori, 2014).

2.3.4 Glutathion reduktasa

Glutathion reduktasa (GR, EC 1.8.1.7) patří do skupiny NADPH depedentních oxidoreduktas a vyskytuje se u prokaryotních i eukaryotních organismů (Gill, et al., 2013). GR je lokalizována zejména v cytosolu, ale můžeme ji najít i v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Romero-Puertas, et al., 2006). Enzym hraje

významnou roli v obraně buňky před ROS udržováním stálé hladiny GSH tím, že katalyzuje redukci GSSG na GSH za současné oxidace NADPH (Gill, et al., 2013).

Strukturně se jedná o homodimer obsahující FAD (flavinadenindinukleotid) jako prostetickou skupinu. U rostlin se vyskytuje zejména ve formě homodimeru, ale můžeme ho najít i jako monomer u *Chlamydomonas* nebo jako heterodimer u *Pisum sativum* a *Zea mays* (Hossain, et al., 2017). U rostlin se vyskytují tři isoformy tohoto enzymu: cytosolická, mitochondriální a chloroplastová. Tyto isoformy jsou stimulovány různými signály z prostředí a za nepříznivých podmínek plní různé funkce (Romero-Puertas, et al., 2006).

Mechanismus působení GR zahrnuje dva kroky. V první fázi je flavinová část redukována pomocí NADPH. Ve druhé fázi je oxidován GSH na GSSG. Pokud se redukovaný enzym nereoxiduje pomocí GSSG může dojít k reverzibilní inaktivaci. V procesu redukce GSSG na GSH působí GR způsobem ping pong, kdy se na něj naváže NADPH a přenáší hydrid na FAD (Hossain, et al., 2017). Kromě toho upravuje GR poměr mezi GSH/GSSG a dodává GSH pro GPX a DHAR. Tyto enzymy pak převádějí peroxid vodíku na vodu (Gill, et al., 2013).

2.3.5 Glutathion-S-transferasa

Glutathion-S-transferasy (GST, EC 2.5.1.18) jsou enzymy, které katalyzují konjugaci GSH s různými hydrofobními, elektrofilními a obvykle cytotoxickými substráty (Marrs, 1996). Při reakci dochází k přidání thiolu redukovaného glutathionu na elektrofilní centra organických sloučenin. Konjugáty glutathionu takto vytvořené látky jsou lépe rozpustné ve vodě, což usnadňuje jejich další odbourávání (Wilce, et al., 1994).

Strukturně se jedná o hydrofobní protein o molekulové hmotnosti 50kDa složený ze dvou podjednotek. Každá GST podjednotka proteinu obsahuje nezávislé katalytické místo složené ze dvou složek. První je vazebné místo specifické pro GSH nebo blízké příbuzný homolog. Druhá složka je místo, kde se váže hydrofobní substrát. Mezi těmito dvěma doménami je krátká variabilní spojovací oblast. V rostlinách je enzym kódován velkým množstvím genů, které můžeme na základě sekvenční identity rozdělit do tříd phi, thau, theta, lambda a zeta (Dixon, et al., 2002). Zatímco zeta a theta mají své příbuzné homology u zvířat, phi a thau jsou typické pro rostliny (Gong, et al., 2005). Enzym se vyskytuje u zvířat, rostlin i bakterií (Abhilash, et al., 2009). Na buněčné úrovni se nachází zejména v cytosolu, výjimečně se nachází v plastidech nebo mitochondriích (Dixon, et al., 2002).

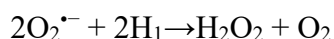
GST hraje důležitou roli v odpovědi na biotický a abiotický stres a v primárním a sekundárním metabolismu, má však i funkci signalizační a regulační (Labrou, et al., 2015). Hlavní funkcí GST v rostlině je konjugace toxického substrátu za vzniku S-glutathionyl reakčního produktu. V rostlinách je pak konjugát rychle transportován prostřednictvím specifických ABC transportérů z cytosolu do vakuoly pro další zpracování. GST hraje v menší míře roli také v sekundárním metabolismu endogenních látek, kde katalyzuje transport flavonoidu z cytosolu do vakuoly. GST se rovněž účastní ochrany rostliny před oxidačním působením, tím že funguje jako GPX. Enzym s použitím glutathionu redukuje organické hydroperoxydy mastných kyselin a nukleových kyselin na odpovídající monohydroxylalkoholy. Další souvislost mezi GST a tolerancí vůči stresu je potlačení apoptózy indukované proteinem Bax. Enzym rovněž může působit proti oxidačnímu stresu prostřednictvím účasti v buněčné signalizaci. Pro zeta GST byla prokázána další katalytická role, která nezahrnuje konjugaci GSH. Arabidopsis zeta GST katalyzuje GSH-dependentní izomerizaci malonylacetoacetátu na fumarylacetoacetát, což je předposlední krok při degradaci tyrosinu (Dixon, et al., 2002).

2.3.6 Superoxid dismutasa

Superoxid dismutasa (SOD, EC 1. 15. 1. 1.) je metaloenzym patřící k nejdůležitějším složkám antioxidačního obranného systému proti ROS (Gill, et al., 2015). SOD se vyskytuje u všech aerobních organismů a ve všech subcelulárních kompartmentech (chloroplasty, mitochondrie, mikrosomy, glyoxysomy, peroxisomy, apoplasty a cytosol) metabolizující kyslík (Gill, et al., 2010). Bylo dokázáno, že fosfolipidová membrána je propustná pro nabitě $O_2^{\cdot-}$ molekuly. Proto je důležité, aby SOD byla přítomna ve všech kompartmentech, kde jsou produkovány $O_2^{\cdot-}$, aby je mohla odstranit (Alscher, et al., 2002).

Na základě kofaktoru, kterým je kov, se SOD dělí do tří skupin: Fe SOD, Mn SOD a Cu/Zn SOD. Tyto isoenzymy se vyskytují v rozdílných kompartmentech. Fe SOD je lokalizována v chloroplastech, Mn SOD v mitochondriích a peroxisomech a Cu/Zn SOD v chloroplastech, cytosolu a potenciálně i v mezibuněčném prostoru (Alscher, et al., 2002). Kromě tří základních isoenzymů rozlišujeme SOD obsahující jako kofaktor nikl. Ni SOD rovněž katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík a byl prokázán u cyanobakterií, námořních gamaproteobakterií a v mořské eukaryotě (Gill, et al., 2015).

SOD představuje první obrannou linii proti působení ROS v buňce (Alscher, et al., 2002). Odstraňuje superoxidový radikál tím, že katalyzuje jeho dismutaci. Jeden $O_2^{\cdot-}$ je redukován na peroxid vodíku a další je oxidován na kyslík. Odstraněním superoxidového radikálu snižuje SOD riziko vzniku hydroxylového radikálu v procesu Heber-Weissovy reakce. Tato reakce je 10 000x rychlejší než rychlost spontánní dismutace (Gill, et al., 2015).



Výsledkem reakce je tvorba H_2O_2 , což je také ROS, který má dvojí roli. Jedná se jednak o toxický produkt, ale také hraje roli v signalizaci. H_2O_2 pak může být účinně detoxifikován pomocí buněčných antioxidačních mechanismů (Gill, et al., 2015).

Cu/Zn SOD je isoforma nejvíce zastoupená u rostlin. Podle struktury rozlišujeme dvě formy Cu/Zn SOD. První typ je homodimerní a vyskytuje se převážně v cytosolu a periplasmě. Druhý typ je homotetramerní a vyskytuje se zejména v chloroplastech a extracelulárně v intersticiální matrix. Cu a Zn jsou v Cu/Zn SOD spojeny disulfidickou vazbou. Důležitějším z těchto dvou atomů je měď. Její substituce nebo úplné vyloučení vede k inaktivaci enzymu. Naopak Zn má spíše roli strukturní než funkční a pomáhá udržovat stabilitu aktivního místa enzymu. Tato isoforma může být inhibována kyanidem a peroxidem vodíku (Gill, et al., 2015).

Fe SOD je pravděpodobně nejstarším typem SOD. Je inhibován pomocí H_2O_2 , ale je rezistentní vůči inhibici kyanidem. Můžeme ho nalézt jak u prokaryot tak i eukaryot. V rostlině se vyskytuje v chloroplastech. Rozlišuje dva typy Fe SOD. Jeden je homodimer složený ze dvou stejných podjednotek proteinu a druhý typ je tetramer složený ze čtyř stejných podjednotek (Gill, et al., 2015).

Mn SOD je homodimerní nebo homotetramerní enzym s jedním Mn na podjednotku. Enzym není inhibován peroxidem vodíku ani kyanidem. Vyskytuje se jak u prokaryot tak i eukaryot. V rostlině se vyskytuje v mitochondriích a peroxisomech (Gill, et al., 2015).

2.4 Anthelmintika

Helmintózy jsou infekční choroby způsobené červy nebo jejich infekčními stádii. Choroby způsobené červy jsou aktuální u všech obratlovců, včetně člověka. Nejrozšířenější helmintózy jsou způsobené třemi třídami červů – oblými červy, kam

řadíme hlístice (*Nematoda*) a ploché červy, kam řadíme motolice (*Trematoda*) a tasemnice (*Cestoda*) (Lamka, et al., 2014).

Anthelmintika představují rozsáhlou skupinou značně různorodých léčiv určených k léčbě helmitóz. Jedná se o léčiva, která jsou většinou syntetického, částečně biosyntetického původu. Podle anthelmintické účinnosti léčiv proti parazitům jednotlivých tříd červů rozlišujeme léčiva na antinematoda, antitrematoda a anticestoda. Mnohá anthelmintika mohou mít současně účinky proti více třídám červů nebo i proti původcům zevních parazitóz (tzv. antiendektoparazitika nebo endektocida) (Lamka, et al., 2014). Mechanismem účinku většiny v současnosti používaných anthelmintik je ovlivnění nervového systému parazita (Opletalová, 2012).

Podle chemické struktury můžeme anthelmintika rozdělit na makrocyclické laktony, benzimidazoly, imidazothiazoly, halogenové salicylanilidy, aminoacetonitrilové deriváty a léčiva jiných struktur (Lamka, et al., 2014).

2.4.1 Benzimidazolová anthelmintika

Benzimidazoly jsou velmi rozsáhlou skupinou anthelmintik se širokým spektrem účinku. Jedná se o léčiva s antinematodní a z části s antitrematodní i anticestodní (výjimečně antimykotickou) aktivitou. Mechanismus účinku je založen na inhibici β -tubulinových podjednotek nezbytných pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. Jejich narušená tvorba se následně projeví žádoucím poškozením funkčnosti celé parazitární buňky. Afinity benzimidazolů k parazitárnímu typu β -tubulinu je mnohonásobně vyšší než k β -tubulinu buněk ošetřovaných zvířat, což umožňuje účinné dávkování benzimidazolů bez vedlejších projevů u léčených zvířat. Většina léčiv skupiny působí proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé látky i ovocidně (Lamka, et al., 2014).

Všechny benzimidazoly mají nízkou rozpustnost ve vodě a absorpce z gastrointestinálního traktu je špatná, nicméně může být zvýšena současným podáváním s jídlem. Léčivo, které je absorbováno, podléhá jaterní biotransformaci a vylučováno je zejména žlučí (většina benzimidazolů), v menší míře pak močí (albendazol) (Page, 2008). Anthelmintická aktivita je závislá na délce přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách a tkáních. U monogastričních zvířat (např. pes, kočka, prase) je třeba využít pro dosažení požadované účinnosti léčiva jeho opakovaného podání, u polygastrických zvířat či dalších býložravců (skot, ovce, kůň a jiní) lze benzimidazoly podávat i jednorázově (Lamka, et al., 2014).

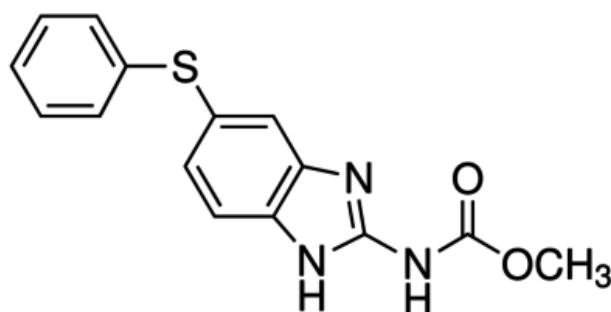
Některé benzimidazoly (fenbendazol, febantel, albendazol) vykazují teratogenní potenciál. Teratogenní účinky jsou závislé na dávce a druhu zvířete a jsou pozorovány pouze v případech, pokud expozice probíhá v kritické fázi embryogeneze (Page, 2008). U části léčiv je kontraindikováno podání laktujícím přežvýkavcům s produkcí určenou pro lidský konzum a podání koním chovaným k jatečným účelům. Vyšší opatrnosti je potřeba dbát v případech poruch jater a ledvin ošetřovaných zvířat (Lamka, et al., 2014).

K anthelmintikům odvozených od benzimidazolu řadíme thiabendazol, mebendazol, flubendazol, fenbendazol, albendazol, oxfendazol a triklabendazol.

2.4.1.1 Fenbendazol

Fenbendazol je antiparazitární léčivo, které je účinné při léčbě širokého spektra střevních parazitů u zvířat včetně tenkohlavce, škravky a měchovce. Fenbendazol je rovněž účinný proti lamblii střevní, je však zapotřebí vyšších dávek. Riziko selhání terapie je až 50%. Pro svoje široké spektrum účinku, bezpečnostní profil (lze jej použít i u březích zvířat) a vysoký stupeň účinnosti je fenbendazol často předepisován veterinárními lékaři. Stejně jako ostatní benzimidazolová anthelmintika, způsobuje fenbendazol degradaci parazitárních mikrotubulů a nevratně blokuje vychytávání glukosy. Inhibice vychytávání glukosy způsobuje vyčerpání energetických zásob u parazita a následně dochází k jeho smrti. Na metabolismus glukosy u savců nemá fenbendazol vliv.

Fenbendazol se používá pro léčbu parazitárních onemocnění u koček, psů, koní, skotu, ovcí a koz. U psů je účinný na většinu střevních parazitů a používá se u nich také pro léčbu plicních parazitů, nicméně je zde nutná delší doba léčby. U koček se fenbendazol používá proti plicním červům, motolicím a některým dalším parazitům (Papich, 2016).



Obr. 2 Chemická struktura fenbendazolu (Ryu, et al., 2013)

2.4.2 Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony jsou léčiva biosyntetického původu s antinematodní a antiectoparazitární účinností. Jsou členěny na avermektiny a milbemyciny. Mezi makrocyclické laktony řadíme ivermektin, moxidektin, doramektin, eprinomektin, abamektin a selamektin (Lamka, et al., 2014).

2.4.2.1 Ivermektin

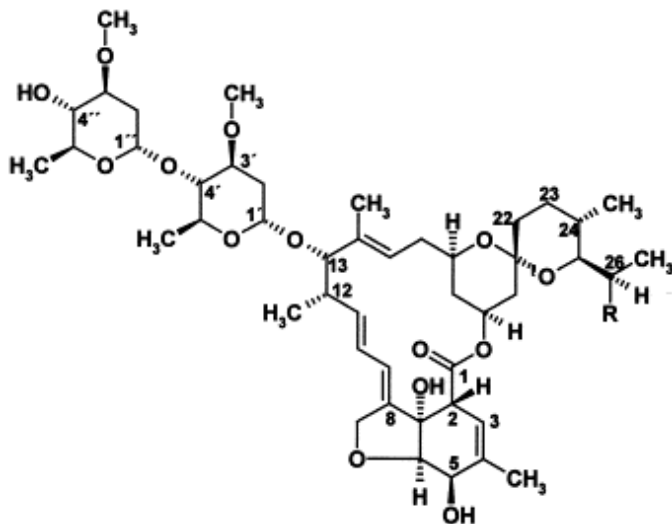
Ivermektin je širokospektré antiparazitární léčivo, které se běžně používá ve veterinární medicíně. Jedná se o fermentační vedlejší produkt bakterií *Streptomyces avermitilis*. Ivermektin je směs dvou homologů (80% B_{1a} a 20% B_{1b}). Přestože vykazuje strukturní podobnost s makrolidovými antibiotiky, ivermektin nemá antibakteriální aktivitu (Scott, 2009).

Ivermektin se nejčastěji používá proti nematodám a proti ektoparazitům (např. roztoči, vši, zákožky). V humánní medicíně slouží především k léčbě onchocerkózy a dalších tropických helmintóz. V zemědělství se ivermektin používá pro své insekticidní, akaricidní a mykocidní účinky. Ivermektin je schválen pro léčbu parazitárních onemocnění u mnoha druhů zvířat (skot, ovce, prasata, koně, psy a kočky), ale není schválen u laktujících krav, koz a ovcí (Gupta, et al., 2014). Přestože otravy ivermektinem mohou nastat u jakéhokoliv zvířecího druhu, některá plemena psů (kolie, border kolie, šeltie, australský ovčák a další) vykazují vyšší citlivost na ivermektin. Je to dáno mutací čtyř bází genu MDR-1 kódující P-glykoprotein (Scott, 2009).

Mechanismus účinku ivermektinu spočívá ve vazbě na glutamát – chloridové kanály na postsynaptických membránách v nervových a svalových buňkách a způsobují nadměrný přísun chloridových iontů, což má za následek paralýzu a následnou smrt parazita (Crump, et al., 2011). Toxický účinek ivermektinu na savce je vysvětlován podobností glutamát – chloridových kanálů parazitů ke GABA – chloridovým kanálům obratlovců, které inhibují interneurony v centrální nervové soustavě. Toxicita ivermektinu spočívá v blokování postsynaptického přenosu nervových impulsů, což posiluje uvolňování a vazbu GABA, a tím je blokován přenos zprostředkovaný γ -aminomáselnou kyselinou (Gupta, et al., 2014).

Ivermektin se rychle vstřebává po perorálním nebo subkutánním podáním. Gastrointestinální absorpce je mnohem rychlejší, až 95% podané dávky se absorbuje a

maximální plasmatické koncentrace dosáhne za 2 až 4 hodiny. Ivermektin se metabolizuje oxidací v játrech a vylučuje se zejména žlučí, pouze 5% je vylučováno močí (Scott, 2009).



Obr. 3 Chemická struktura ivermektinu (Skálová, et al., 2001)

2.4.3 Rezistence na anthelmintika

Mnoho parazitů vyskytujících se u zvířat má genetické předpoklady k tomu, aby se u nich vyvinula rezistence na podávaná anthelmintická léčiva (Kaplan, 2004). Za posledních 10-15 let byl zaznamenán celosvětový nárůst rezistence na anthelmintika. Rezistentní kmeny parazitů byly pozorovány prakticky u všech druhů hospodářských zvířat. V mnoha částech světa se vyskytují multirezistentní kmeny parazitů a na některých kozích nebo ovčích farmách se dokonce vyskytuje rezistence vůči všem dostupným lékům. Obecně je problém rezistence méně závažný u skotu a koní než u malých přežvýkavců (ovce, koza), ale i tam lze předpokládat, že se situace bude postupně zhoršovat. Navíc od doby uvedení ivermektinu na trh v roce 1981 nebyla s výjimkou monepantelu (aminoacetonitrilový derivát) na trh uvedena žádná nová skupina anthelmintik. Možnosti léčby jsou tak často velmi omezené. Proto je důležité, aby byla léčiva proti červům podávána racionálně, a aby byla dodržena rotace léčiv s různými mechanismy účinku (Kaplan, et al., 2012).

2.5 Fytoremediace

V dnešní době existuje řada *in situ* a *ex situ* technologií více či méně technicky a ekonomicky náročných, vedoucích k částečnému nebo úplnému odstranění problematického xenobiotika ze životního prostředí. Bohužel řada těchto metod představuje hrubý zásah do krajiny, kdy může docházet k narušení rovnováhy ekosystémů. Jednou z šetrnějších metod k životnímu prostředí jsou fytoremediační technologie (Vaněk, et al., 2017), které využívají zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění či transformaci kontaminantů ze životního prostředí (Soudek, et al., 2008). Důležitým předpokladem pro úspěšnou sanaci prostředí pomocí fytoremediace je volba vhodné rostliny a především morfologie kořene a jeho délka. Mezi rostlinami používaných pro tyto účely můžeme najít jak rostliny s vláknitým kořenovým systémem (trávy), který umožňuje díky velkému povrchu maximální kontakt s půdou, tak i rostliny, jejichž kořenovému systému dominuje jeden centrální kořen (řada hyperakumulátorů). Délka kořene pak mimo jiné závisí na podmínkách prostředí (úrodnost a struktura půdy, množství vody v půdě, koncentrace kontaminantů). Dalším kritériem je objem biomasy. Přednost mají rostliny s jeho větším objemem. Volí se rostliny široce rozšířené, snadno dostupné a dobře rostoucí. Častěji jsou používány suchozemské rostliny, které mají vyvinutější kořenový systém než vodní rostliny. Je důležité zvolit rostlinu vhodnou pro dané klima, půdní podmínky a také s dostatečnou schopností fytoremediace. U každé rostliny se pak také zvažuje odolnost vůči chladu, horku, chorobám, stresu, hmyzu a chemikáliím (Vaněk, et al., 2017).

Využití zelených rostlin jako nástroje k odstranění kontaminantů z prostředí má ve srovnání s dalšími metodami remediace řadu výhod. Minimálně zatěžuje životní prostředí, nenarušuje krajinu a s ní spojené ekosystémy. Využívá dobře zvládnutelných agrotechnologií, nemá negativní dopad na úrodnost a strukturu půdy, přítomnost rostliny může naopak zlepšit vlastnosti půdy. Ve srovnání s jinými remediačními technologiemi vzniká menší množství sekundárních odpadů, které by vyžadovaly další zpracování. Je použitelná pro široké spektrum kontaminantů. Čerpá energii ze slunečního záření, a proto ji lze považovat za technologii napomáhající snižovat emise skleníkových plynů a při fotosyntéze spotřebovává oxid uhličitý. Vegetace může omezit erozi a odnášení prachu větrem nebo jí dokonce zamezit. Mohou být použity jako indikátory rozsahu kontaminace i úspěšnosti remediace. Je vhodná pro velké plochy

s relativně tenkou vrstvou kontaminované půdy nebo velkém množství vod s nízkou koncentrací znečištění v dosahu kořenů rostlin (Vaněk, et al., 2017).

Tato metoda má nicméně i své limity a nevýhody. Fytoremediace má většinou pomalý průběh, protože je závislá na rychlosti růstu rostliny, rychlosti vývoje kořenového systému a je limitována klimatickými a geologickými podmínkami. Lze ji použít, pouze pokud je kontaminant v zóně vlivu kořenů rostliny. Nedosahuje-li rostlina svými kořeny do zóny je nutno kontaminované medium přemístit do kontaktu s rostlinou (např. hlubokou orbou). Existuje zde určité riziko přestupu kontaminantu do jiného media nebo potravního řetězce, čemuž se musí předcházet, zejména pokud probíhá transformace kontaminantu na toxičtější metabolit. Zde je nutno znát metabolickou dráhu polutantu v rostlině. Metoda je mimochodem náročnější na prostor oproti jiným metodám. Může při ní dojít k rozšíření nevhodných a invazivních druhů rostlin, které mohou nepříznivě ovlivnit ekosystém, a proto nelze navrhnout její univerzální model. Jde o technologii specifickou pro dané místo a typ kontaminantu (Vaněk, et al., 2017). Jedná se však o poměrně novou technologii remediace, která má do budoucna velký potenciál.

2.5.1 Fytoremediační techniky

2.5.1.1 Fytodegradace

Fytodegradace je metoda, která využívá rostliny a s nimi asociovanou mikroflóru k degradaci kontaminantů na netoxické látky. Podmínkou pro úspěšné použití metody je, aby produktem metabolických aktivit byly látky netoxické nejen pro rostlinu, ale i pro ostatní organismy (Vaněk, et al., 2017). Typickými rostlinami používanými při této metodě jsou rostliny z čeledi *Salicaceae* (topol americký, vrby), trávy (žito, rákos, kostřava) nebo rostliny z čeledi *Fabaceae* (jetel, vojtěška) (Soudek, et al., 2008).

2.5.1.2 Rhizodegradace

Rhizodegradace je biologickou dekontaminací znečištěných míst se zvýšenou bakteriální a houbovitou aktivitou v rhizosféře určitých cévnatých rostlin (Boušová, et al., 2013). Rostlinami používané pro tuto metodu jsou traviny s vláknitými kořeny (žito, kostřava), uvolňovače fenolických látek (moruše, jabloň) nebo freatofytické stromy (Soudek, et al., 2008). Výhodou metody je, že není nutné rostliny sklízet a zpracovávat

je, protože v nich nedochází k akumulaci kontaminantu. Metoda je limitována rychlostí růstu kořene a hloubkou kořenové zóny (Vaněk, et al., 2017).

2.5.1.3 Fytostabilizace

Fytostabilizace využívá rostliny k imobilizaci kontaminantů. Účinnost fytostabilizace závisí na fyzikálních, chemických a biologických vlastnostech půdy. Fytostabilizace lze využít tam, kde je potřeba obnovit vegetační pokrývku, ale kvůli vysoké kontaminaci nelze na zasaženém území aplikovat běžnou vegetaci nebo na finální úpravu ploch, kde byly použity k odstranění znečištění jiné sanitační technologie. Jako rostliny se používají freatofytické stromy a trávy s vláknitými kořeny. Nevýhodou fytostabilizace je dlouhá doba remediace (Soudek, et al., 2008; Vaněk, et al., 2017).

2.5.1.4 Fytoextrakce

Je metoda založená na absorpci kontaminantu kořeny rostliny a následnou akumulací v nadzemní části rostliny. Poté jsou rostliny sklizeny a zpracovány (např. termicky, mikrobiálně, chemicky). Metoda se s úspěchem používá pro sanaci (např. těžkých kovů, polokovů), ale není příliš vhodná pro odstranění organických sloučenin, které mohou být rostlinou metabolizovány na toxičtější produkty (Soudek, et al., 2008). Nutným předpokladem pro fungování metody je hyperakumulační schopnost rostliny vůči stanovanému kontaminantu (rostliny z čeledi *Brassicaceae*) (Vaněk, et al., 2017).

2.5.1.5 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je mechanismem, při němž rostliny přeměňují kontaminanty do těkavého stavu (Boušová, et al., 2013). Jedná se o poměrně kontroverzní metodu, neboť nedochází k odstranění kontaminantu, ale pouze k jeho přesunu z půdy do ovzduší. Rostlinami používanými k fytovolatilizaci jsou *Brassica juncea*, mokřadní rostliny a freatofytické stromy (Soudek, et al., 2008).

2.5.1.6 Hydraulická kontrola

Hydraulická kontrola je mechanismem pro minimalizaci migrace znečišťujících látek. Rostliny fungují jako organické pumpy pohlcující velké objemy vody jako součást transpiračního procesu (Boušová, et al., 2013). Pro hydraulickou kontrolu se nejlépe

osvědčily rostliny nebo stromy se dlouhými kořeny schopné přijímat velké množství vody (např. bavlík, vrba, topol) (Vaněk, et al., 2017).

2.5.1.7 Rhizofiltrace

Rhizofiltrace se aplikuje při odstraňování kontaminantu z povrchových, splaškových nebo vyčerpaných podzemních vod použitím kořenového systému rostlin. Na rozdíl od fytoextrakce jsou cílovou částí rostliny kořeny. Metoda je cenově výhodná pro případy znečištění velkého objemu vody malými koncentracemi polutantů. Při rhizofiltraci se uplatňují převážně vodní rostliny (řasy, palístek vodní) a rostliny mokřadní (orobinec širokolistý) (Soudek, et al., 2008).

2.6 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Huseníček rolní je běžně se vyskytující rostlina z čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) a je typickým příkladem tzv. efemerní rostliny. Jedná se o jednoletou či ozimou bylinu s přízemní listovou růžicí. Lodyha je přímá a často větvená, s výjimkou odstávajících chlupů v dolní třetině je celá lysá a dorůstá zpravidla 5-30 cm výšky. Listy přízemní růžice jsou obkopynaté, celokrajné či oddáleně zubaté, v jejich odění jsou přítomny i trojramenné chlupy. Úzce eliptické lodyžní listy přisedají zúženou bází. Květy skládají hrozen. Kališní lístky jsou žlutozelené s často nafialovělou špičkou, korunní lístky 2-4 mm dlouhé a bílé. Plodem jsou šikmo od lodyhy odstávající šešule.

Rozšíření druhu zaujímá celou Evropu s výjimkou nejsevernějších oblastí. Huseníček rolní však roste i ve střední Asii, na Kavkazu, na pobřeží Malé Asie a v severní a východní Africe. Druhotně pak roste v Číně, Japonsku, jižní Africe, Severní Americe a v Austrálii. V ČR se druh hojně vyskytuje v termofytiku a mezofytiku na přirozených i druhotných stanovištích. Méně častý je v oblastech s karbonátovým podložím a v oreofytiku (zde zavlékán na antropogenně ovlivněná stanoviště). Roste na polích, okrajích cest a mezích, úhorech, v okolí železnic a na skalnatých svazích. Je druhem iniciálních sukcesních stádií. Kvete od dubna do října (Hanzl, 2008).

Na potenciál *Arabidopsis thaliana* jako první poukázal Friedrich Laibach (Koornneet, et al., 2010). Pro jeho využití jako modelového organismu je výhodný zejména krátký životní cyklus, bohatá produkce semen, snadná kultivace, prostorová nenáročnost a malá velikost genomu. Kompletní genom huseníčku rolního byl

sekvenován v roce 2000 jako první rostliny (obsahuje okolo 125 milionů bází sekvence a kóduje přibližně 25 500 genů) (Foundation, 2017).



Obr. 4 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)
(Tenaglia, 2007)

3 Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak vybraná léčiva ovlivňují aktivitu vybraných antioxidantních enzymů.

1. Příprava rostlinných kultur *Arabidopsis thaliana*
2. Inkubace suspenzní kultury s vybranými anthelmintiky (FEN, IVM)
3. Extrakce vzorků rostlinného materiálu
4. Stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích
5. Změření aktivity jednotlivých enzymů

4 Experimentální část

4.1 Modelový systém

Experimenty byly prováděny na buněčných suspenzích, která byla získána z listů rostliny *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní, semena *Arabidopsis thaliana* WT, Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, Praha). Pěstování rostliny i suspenzní kultury bylo prováděno za aseptických podmínek v prostorách ÚEB AVČR.

4.2 Použité chemikálie a reagentie

Stupeň čistoty: p.a.

1-chlor-2,4-dinitrobenzen (Penta)

Bradfordové činidlo (Sigma Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich)

Ethanol 96% (Penta)

Fenbendazol (FEN) (Sigma Aldrich)

Glutathion (GSH) (Biochemica)

Glutathion disulfid (GSSG) (Sigma Aldrich)

Guaiakol (Sigma Aldrich)

Hydrogenfosforečnan draselný (Penta)

Ivermektin (IVM) (Sigma Aldrich)

Kyselina askorbová (Sigma Aldrich)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma Aldrich)

Kyselina chlorovodíková (Penta)

Nikotinamidadeninindinukleotidfosfát (NADPH) (Sigma Aldrich)

Peroxid vodíku (Penta)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich)

Polyvinylpyrrolidon (Sigma Aldrich)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma Aldrich)

Tris pufr (tris(hydroxymethyl) aminomethan (Sigma Aldrich)

Triton – X 100 (Sigma Aldrich)

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Živné medium V₄

Tabulka1 Složení živného media V₄

zásobní roztok (ZR)	složení	koncentrace v ZR [g/500 ml]	objem ZR [ml/l]
V ₄ – A	KCl	3,75	100
	NaNO ₃	3	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,25	
	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,625	
V ₄ – B	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,75	10
	CaCl ₂ .6H ₂ O	5,59	
	CaCl ₂	2,85	
V ₄ – C	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,5	1
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,015	
	H ₃ BO ₃	0,5	
	KI	0,005	
	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,015	
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,015	
F – MS	Na ₂ EDTA	1,86	10
	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39	
V ₄ – VITAMÍNY	thiamin – HCl	1mg/100ml	10
	pyridoxin – HCl	1mg/100ml	
	kys. nikotinová	5mg/100ml	
	glycin	30mg/100ml	
NAA		10mg/100ml	10
2,4 – D		10mg/100ml	10

Do živného media bylo nakonec přidáno 0,1g inositolu, 1g kasein hydrolyzátu a 30g sacharosy. Hodnota pH se upravila na rozmezí 5,75 – 5,8.

4.3.2 Extrakční pufr

Tabulka2 Složení extrakčního pufru na 200ml

Látka	Množství
0,1mMEDTA	5,8mg
PVP 1%	2g
Tritonu-X100 0,5%	1ml

Vše bylo smícháno v požadovaném objemu destilované vody.

4.4 Použité přístroje

Analytické váhy, Sartorius

Autokláv, H+P Labortechnik Steamsterilizer Varioklav 75 T

Automatické pipety Eppendorf

Centrifuga, Biofuge Stratos Heraeus

Centrifuga, Thermo Scientific Sorvall WX Ultra

Laminární box, Holten Laminair model 1.2

Magnetická míchačka, IKA Color Squid Wildcat Stirrer

pH metr, WTW InoLab

Spektrofotometr, TECAN Infinite M200

Thermomixer, Eppendorf comfort

Třepačka, Edmund Bühler KS 15, Fisher Scientific s.r.o

Třepačka, MS2 Minishaker IKA

Ultrazvukový homogenizér, Bandelin Sonoplus

4.5 Metodika

4.5.1 Kultivace buněk *in vitro*

Suspenzní kultura *Arabidopsis thaliana* byla kultivována ve sterilních Erlenmeyerových baňkách s živným médiem V₄ (Tabulka 1) na rotační třepačce ve tmě za konstantní teploty (24°C) po dobu 24 hod. Po kultivaci bylo k suspenzi přidáno 100µl 10mM zásobního roztoku IVM nebo FEN (rozpuštěno v DMSO).

4.5.2 Odběr a příprava rostlinného materiálu

Vzorky byly odebírány po 8, 24 a 72 hod v triplicátech. Homogenizace rostlinného materiálu (0,5 g) probíhala v tekutém dusíku při teplotě do 4°C. Zhomogenizované vzorky se 4 ml extrakčního pufru (Tabulka 2) byly centrifugovány při 10 000g (1 min, 4°C), následně při 14 000g (20 min, 4°C) pro získání cytosolové frakce a následně pro mikrosomální frakce 100 000g (1 hod, 4°C). Vzniklý supernatant byl rozpipetován a zamražen na -80°C.

4.5.3 Stanovení bílkoviny

Koncentrace bílkoviny ve vzorcích byla stanovena spektrofotometricky metodou podle Bradfordové. Princip této metody spočívá ve změně barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) po navázání na protein (Compton, et al., 1985).

Za laboratorní teploty bylo do jamek napipetováno 5 μ l vzorku a 250 μ l činidla CBBG. Měření bylo prováděno na mikrotitrační destičce GAMA. Společně se vzorky byla měřena i řada standardů (kalibrační křivka) o koncentraci 0 – 1400 μ g/ml a nebo byly použity standardy ze sady na měření proteinu (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 2, BIO-RAD Laboratories) o koncentraci 0,125 – 2,0 mg/ml. Vzorky byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě v termomixéru za současného třepání. Následně byla změřena absorbance při 595nm.

4.5.4 Peroxidasa

Měření aktivity peroxidasy je založeno na principu přeměny guaiakolu na žlutě zbarvený tetraguaiakol v přítomnosti peroxidu vodíku (Drotar, et al., 1985).

Změna absorbance byla měřena kineticky po dobu 5 min při 420nm na mikrotitrační destičce Greiner. Do každé jamky bylo napipetováno 190 μ l reakční směsi (27ml 50mM pufru Tris/HCl o pH 6; 600 μ l 3,4mM guaiakolu; 600 μ l 9mM H₂O₂) a 10 μ l vzorku. Reakční směs byla připravena těsně před měřením z důvodu nestability peroxidu vodíku.

Rozdíl absorbance za čas ($\Delta A/\text{min}$) zjištěný z oblasti lineárního poklesu byl použit pro výpočet aktivity. Specifická aktivita byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

Výpočet aktivity:

$$EA = k \cdot V / \varepsilon \cdot d \cdot v$$

EA...enzymová aktivita

k ... směrnice přímky

V ... celkový objem roztoku (200 μ l)

ε ... extinkční koeficient (26,6 mM/cm)

d ... výška hladiny roztoku v jamce (0,594 cm)

v ... objem vzorku (10 μ l)

4.5.5 Katalasa

Metoda je založena na principu měření úbytku peroxidu vodíku ve vzorku (Verma, et al., 2003).

Změna absorbance byla měřena kineticky ve 20 sekundových intervalech (0 – 280 sec) při 240nm na mikrotitrační destičce Greiner. Do každé jamky bylo napipetováno 10 μ l vzorku a 140 μ l substrátu (2ml 50mM fosfátového pufru o pH = 7; 102,15 μ l 0,1M peroxidu vodíku a 7,9ml destilované vody).

Rozdíl absorbance za čas ($\Delta A/\text{min}$) zjištěný z oblasti lineárního poklesu byl použit pro výpočet aktivity. Specifická aktivita byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

Výpočet aktivity:

$$EA = k \cdot V / \varepsilon \cdot d \cdot v$$

EA ... enzymová aktivita

k ... směrnice přímky

V ... celkový objem roztoku (150 μ l)

ε ... extinkční koeficient (0,036mM/cm)

d ... výška hladiny roztoku v jamce (0,463cm)

v ... objem vzorku (10 μ l).

4.5.6 Askorbát peroxidasa

Metoda je založena na oxidaci kyseliny askorbové v přítomnosti peroxidu vodíku na askorbát (Vanacker, et al., 1998).

Změna absorbance byla měřena kineticky po dobu 5 min (30 sec intervaly) při 290nm na mikrotitrační destičce Greiner. Do každé jamky bylo napipetováno 20 μ l vzorku, 144 μ l 50mM fosfátového pufru, 18 μ l 6mM roztoku kyseliny askorbové (9ml vody; 1ml 0,5M fosfátového pufru a 10mg kyseliny askorbové) a 18 μ l 2mM roztoku peroxidu vodíku (9ml vody; 1ml 0,5M fosfátového pufru a 2 μ l peroxidu vodíku).

Rozdíl absorbance za čas ($\Delta A/\text{min}$) zjištěný z oblasti lineárního poklesu byl použit pro výpočet aktivity. Specifická aktivita byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

Výpočet aktivity:

$$EA = k \cdot V / \varepsilon \cdot d \cdot v$$

EA ... aktivita enzymu

k ... směrnice přímky

V ... celkový objem roztoku (200 μ l),

ε ... extinkční koeficient (2,8mM/cm)

d ... výška hladiny roztoku v jamce (0,594cm)

v ... objem vzorku (20 μ l)

4.5.7 Glutathionreduktasa

Metoda je založena na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za současné oxidace NADPH (Bonilla, et al., 2008).

Změna absorbance byla měřena po dobu 6 min při 340nm na GAMA mikrotitrační destičce za teploty 37°C. Do každé jamky bylo napipetováno 50 μ l vzorku (5x zředěn) a 150 μ l mastermixu (6ml 0,1M K- fosfátového pufru o pH =7; 4,8ml 5mM EDTA; 6ml 4mM GSSG; 1,2 ml 2,5mM NADPH).

Rozdíl absorbance za čas ($\Delta A/\text{min}$) zjištěný z oblasti lineárního poklesu byl použit pro výpočet aktivity. Specifická aktivita byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

Výpočet aktivity:

$$EA = \frac{(\Delta Avz - \Delta Asl) \cdot V}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s} \cdot 1000$$

EA ... aktivita enzymu

ΔAvz ... rozdíl absorbance vzorku mezi 1. a 6. minutou podělené dobou, po kterou probíhala reakce

ΔAsl ... rozdíl absorbance slepého vzorku mezi 1. a 6. minutou dělený dobou, po kterou probíhala reakce

V ... celkový objem roztoku (0,2ml)

ε ... extinkční koeficient NADPH (6,22mM/cm)

l ... výška hladiny roztoku v jamce (0,75cm)

V_s ... objem vzorku (0,01ml, zahrnuto zředění 5x)

4.5.8 Gluathion-S-transferasa

Měření aktivity glutathion-S-transferasy je založeno na principu tvorby konjugátu GSH s CDNB (Ye, et al., 2001).

Změna absorbance byla měřena kineticky 6x v minutových intervalech při 340nm na mikrotitrační destičce Greiner za teploty 37°C. Do každé jamky bylo napipetováno 6μl vzorku (5x zředěn) a 194μl reakční směsi (4ml 5,15mM roztoku GSH; 0,4ml 51,5mM roztoku CDNB a 15,6ml 0,1M Na-fosfátového pufru o pH=6,5).

Rozdíl absorbance za čas ($\Delta A/\text{min}$) zjištěný z oblasti lineárního poklesu byl použit pro výpočet aktivity (molární extinkční koeficient 9,6 mM/cm). Specifická aktivita byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

4.5.9 Superoxid dismutasa

Měření aktivity superoxid dismutasy je založeno na principu redukce tetrazolinové soli (WST-1) na formazan v přítomnosti superoxidového aniontu (Ukeda, et al., 2002).

K měření byl použit set SOD Assay Kit-WST (Sigma Aldrich). Změna absorbance byla měřena kineticky při 450nm na GAMA mikrotitrační destičce po inkubaci (37°C, 20 min).

Tabulka 3 Množství jednotlivých roztoků pro vzorek a Blank 1- 3

	Vzorek	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Vzorek	20 μl	-	20 μl	-
Destilovaná voda	-	20 μl	-	20 μl
WST pracovní roztok (1ml WST/15ml roztok pufru)	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Roztok ředícího pufru	-	-	20 μl	20 μl
Roztok enzymu (15μl roztoku enzymu/2,5ml roztok ředícího pufru)	20 μl	20 μl	-	-

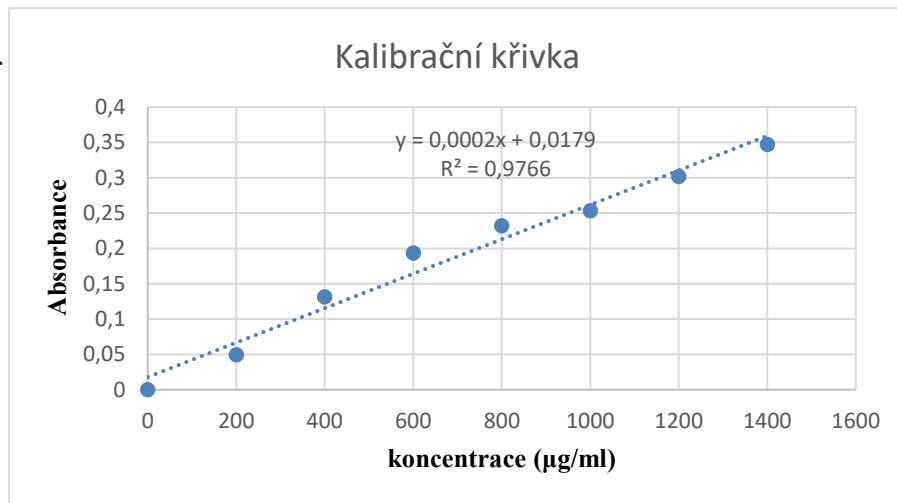
Rozdíl absorbance za čas ($\Delta A/\text{min}$) zjištěn z oblasti lineárního poklesu byl použit pro výpočet aktivity (molární extinkční koeficient 37 000M/cm). Specifická aktivita byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

4.5.10 Statistická analýza

Analýza dat byla provedena za použití twoway ANOVA s Bonferroni post hoc testem (GraphPad Prism 7.0 Software, La Jolla, CA, USA). Všechny hodnoty byly vyjádřeny jako průměr \pm SD. Za statisticky významnou byla považována pravděpodobnost $p < 0,05$.

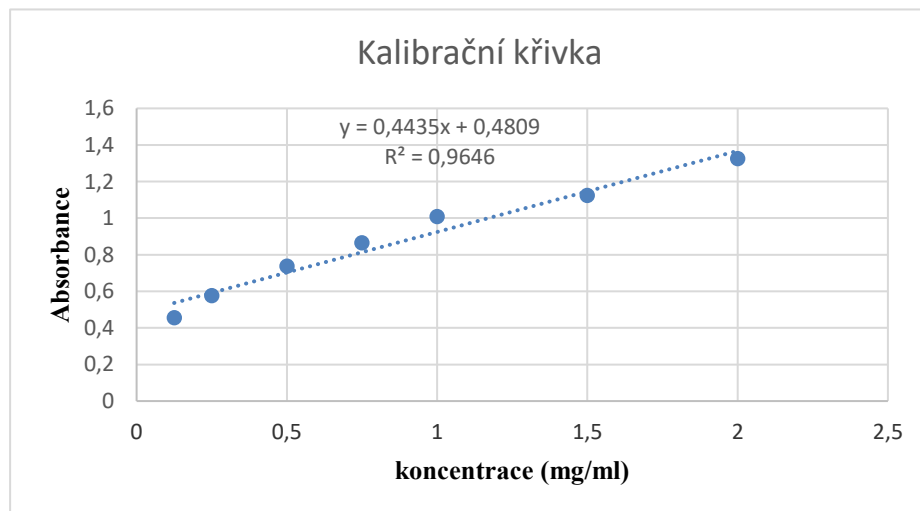
5 Výsledky

5.1 Stanovení bílkoviny



Obr. 5 Kalibrační křivka stanovení bílkoviny za použití standardů o koncentraci 0 – 1400 µg/ml na FaF UK v Hradci Králové

Každý bod je aritmetickým průměrem 4 měření ($n = 4$). Z kalibrační přímky je patrné, že absorbance roste se zvyšující se koncentrací. Podle výsledné rovnice lineární regrese se vypočítaly koncentrace proteinů ve vzorcích.



Obr. 6 Kalibrační křivka stanovení bílkoviny za použití standardů ze sady na měření proteinu (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 2, BIO – RAD Laboratories) o koncentraci 0,125 – 2,0 mg/ml na ÚEB AVČR v Praze.

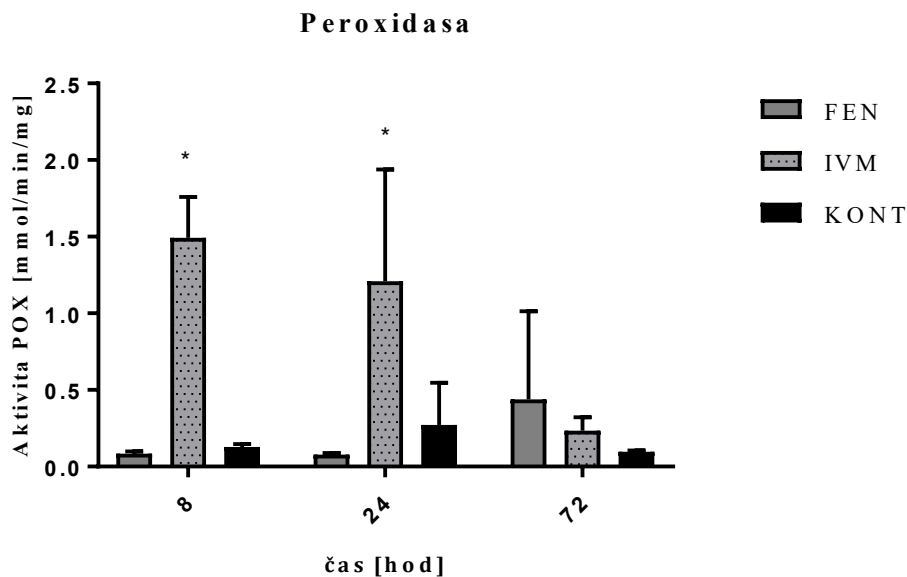
Každý bod je aritmetickým průměrem 3 měření ($n = 3$). Z kalibrační křivky je patrné, že absorbance roste se zvyšující se koncentrací. Podle výsledné rovnice lineární regrese se vypočítaly koncentrace proteinů ve vzorcích.

5.2 Peroxidasa

Tabulka 4 Aktivita peroxidasy (mmol/min/mg)

FEN	průměr	smodch	IVM	průměr	smodch	KONT	průměr	smodch
8 hod	0,082	0,013	8 hod	1,492*	0,218	8 hod	0,128	0,016
24 hod	0,078	0,009	24 hod	1,210*	0,595	24 hod	0,272	0,224
72 hod	0,439	0,469	72 hod	1,351	0,141	72 hod	0,097	0,007

*p < 0.05 (statistická významnost)



Obr. 7 Závislost aktivity peroxidasy na době, po kterou byly buňky *Arabidopsis thaliana* vystaveny působení léčiv IVM/FEN. Hodnoty představují průměr ze tří měření (n = 3).

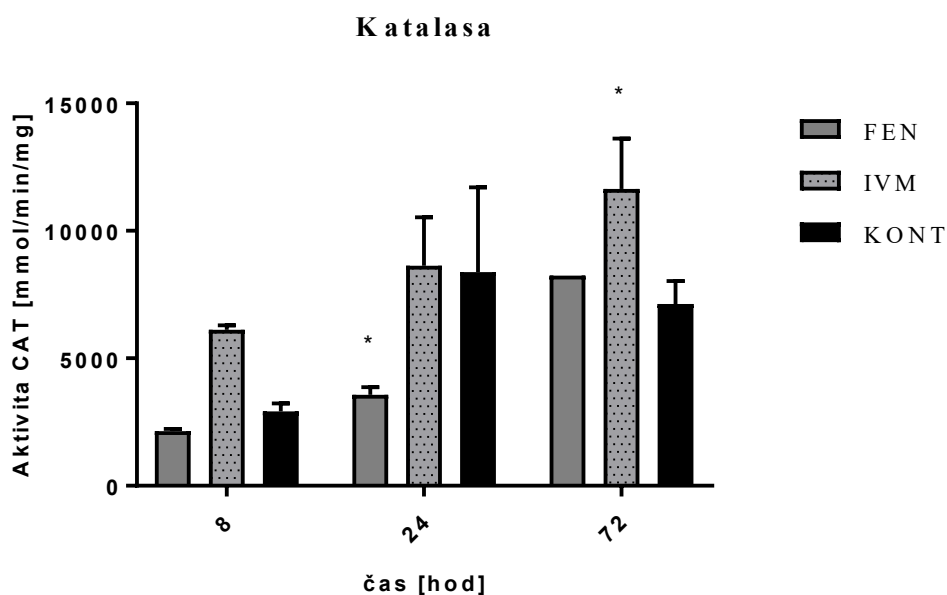
Na obr. 7 je vidět, že aktivita peroxidasy signifikantně vzrostla po 8 a 24 hod u buněk po expozici IVM, naopak u buněk exponovaných FEN aktivita vzrostla až po 72 hod vzhledem ke kontrolnímu vzorku, nicméně dle statistického vyhodnocení se nárůst aktivity nejeví signifikantně, z důvodu vysoké směrodatné odchylky.

5.3 Katalasa

Tabulka 5 Aktivita katalasy (mmol/min/mg)

FEN	průměr	smodch	IVM	průměr	smodch	KONT	průměr	smodch
8 hod	2149,4	70,9	8 hod	6123,8	139,4	8 hod	2916,7	259,9
24 hod	3571,1*	244,6	24 hod	8634,9	1550,2	24 hod	8384,4	2712,2
72 hod	8244,0	4,0	72 hod	11641,6*	1615,7	72 hod	7126,6	733,9

* $p < 0.05$ (statistická významnost)



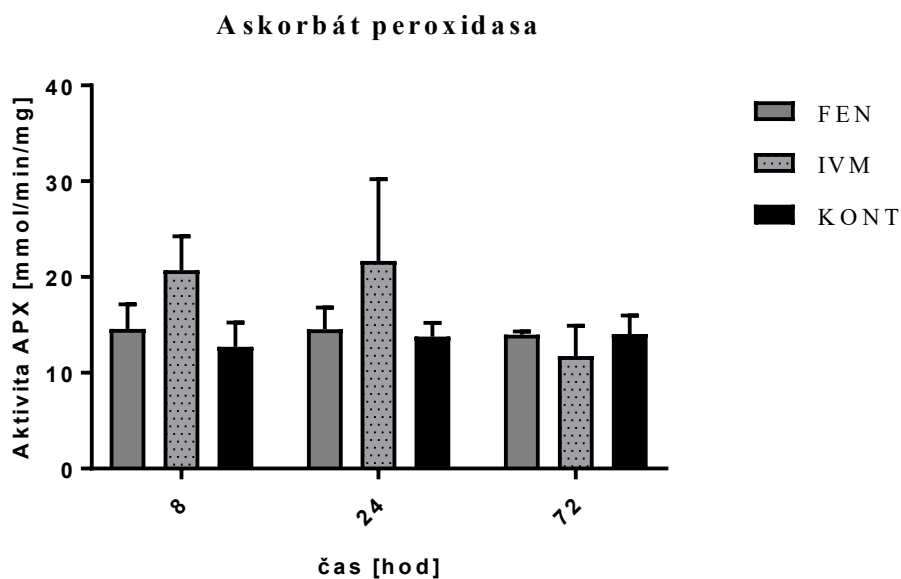
Obr. 8 Závislost aktivity katalasy na době, po kterou byly buňky *Arabidopsis thaliana* vystaveny působení IVM/FEN. Hodnoty představují průměr ze tří měření ($n = 3$).

Na obr. 8 je vidět, že aktivita katalasy u buněk exponovaných IVM lineárně roste a po 72 hod je její aktivita signifikantně vyšší než aktivita CAT u kontrolního vzorku. Naopak aktivita enzymu u buněk vystavených působení FEN je po 8 a 72 hod srovnatelná a po 24 hod signifikantně nižší než u kontrolního vzorku.

5.4 Askorbát peroxidasa

Tabulka 6 Aktivita askorbát peroxidasy (mmol/min/mg)

FEN	průměr	smodch	IVM	průměr	smodch	KONT	průměr	smodch
8 hod	14,6	2,1	8 hod	20,7	2,9	8 hod	12,7	2,1
24 hod	14,6	1,8	24 hod	21,7	7,0	24 hod	13,8	1,2
72 hod	14,0	0,3	72 hod	11,7	2,6	72 hod	14,0	1,6



Obr. 9 Závislost aktivity askorbát peroxidasy na době, po kterou byly buňky *Arabidopsis thaliana* vystaveny působení léčiv IVM/FEN. Hodnoty představují průměr ze tří měření ($n = 3$).

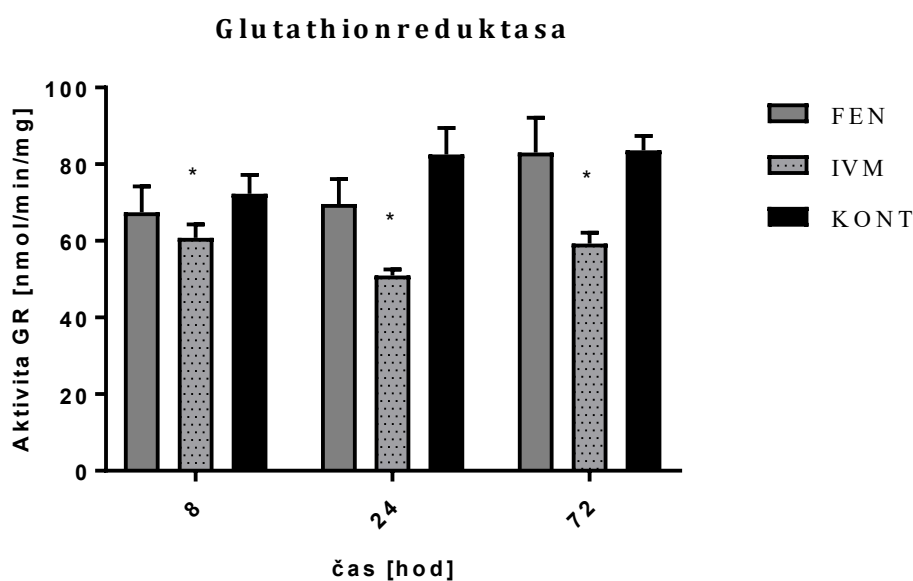
Na obr. 9 je vidět, že aktivita enzymu nejeví po celou dobu měření signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolním vzorkem a to jak u buněk vystavených působení IVM, tak i u buněk vystavených působení FEN.

5.5 Glutathionreduktasa

Tabulka 7 Aktivita glutathionreduktasy (nmol/min/mg)

FEN	průměr	smodch	IVM	průměr	smodch	KONT	průměr	smodch
8 hod	67,5	3,1	8 hod	60,8*	3,5	8 hod	72,3	4,8
24 hod	69,6	6,5	24 hod	51,0*	1,5	24 hod	82,6	6,9
72 hod	83,0	7,4	72 hod	59,3*	2,8	72 hod	83,6	3,8

*p < 0.05 (statistická významnost)



Obr. 10 Závislost aktivity glutathionreduktasy na době, po kterou byly buňky *Arabidopsis thaliana* vystaveny působení léčiv IVM/FEN. Hodnoty představují průměr ze tří měření (n = 3).

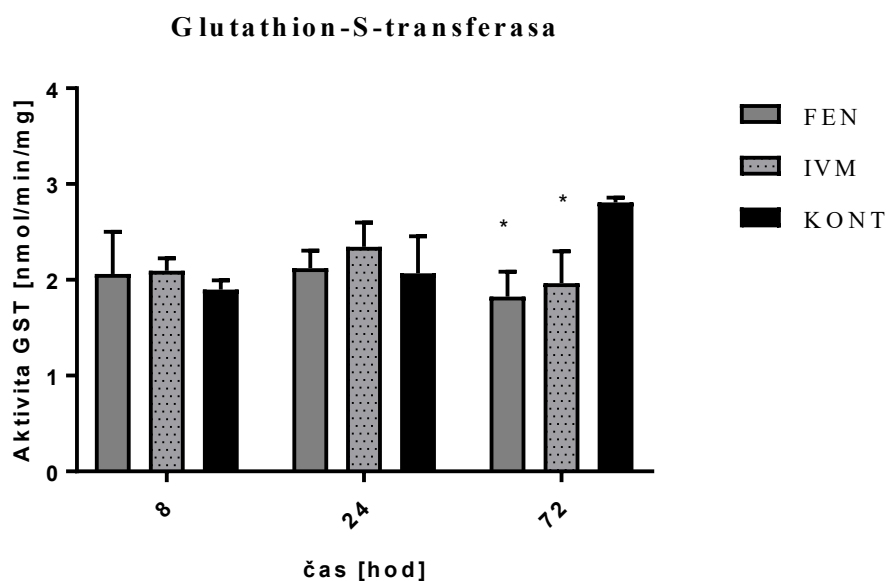
Na obr. 10 je vidět, že aktivita enzymu u buněk exponovaných FEN je srovnatelná s kontrolním vzorkem. U buněk vystavených působení IVM dochází k signifikantnímu poklesu aktivity enzymu v porovnání s kontrolním vzorkem.

5.6 Glutathion-S-transferasa

Tabulka 8 Aktivita glutathion-S-transferasy (nmol/min/mg)

FEN	průměr	smodch	IVM	průměr	smodch	KONT	průměr	smodch
8 hod	2,1	0,4	8 hod	2,1	0,1	8 hod	1,9	0,1
24 hod	2,1	0,2	24 hod	2,3	0,3	24 hod	2,1	0,4
72 hod	1,8*	0,2	72 hod	2,0*	0,3	72 hod	2,8	0,1

* $p < 0.05$ (statistická významnost)



Obr. 11 Závislost glutathion-S-transferasy na době, po kterou byly buňky *Arabidopsis thaliana* vystaveny působení léčiv IVM/FEN. Hodnoty představují průměr ze tří měření ($n = 3$).

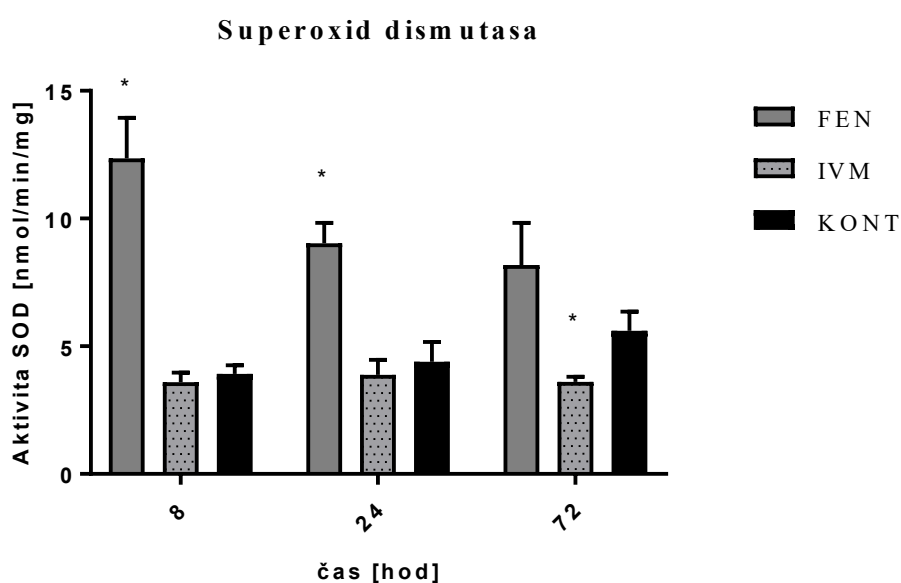
Na obr. 11 je vidět, že aktivita enzymu je v přítomnosti obou léčiv po 8 a 24 hod srovnatelná s kontrolním vzorkem. Naopak po 72 hod je aktivita enzymu u obou vzorků s léčivem signifikantně nižší oproti kontrolnímu vzorku.

5.7 Superoxid dismutasa

Tabulka 9 Aktivita superoxid dismutasy (nmol/min/mg)

FEN	průměr	smodch	IVM	průměr	smodch	KONT	průměr	smodch
8 hod	12,4*	1,6	8 hod	3,6	0,4	8 hod	3,9	0,3
24 hod	9,0*	0,8	24 hod	3,9	0,6	24 hod	4,4	0,8
72 hod	8,2	1,3	72 hod	3,6*	0,2	72 hod	5,6	0,7

*p < 0.05 (statistická významnost)



Obr. 12 Závislost aktivity superoxid dismutasy na době, po kterou byly buňky *Arabidopsis thaliana* vystaveny působení léčiv IVM/FEN. Hodnoty představují průměr ze tří měření (n = 3).

Na obr. 12 je vidět, že aktivita enzymu u buněk vystavených působení FEN je signifikantně vyšší po 8 a 24 hod v porovnání s kontrolním vzorkem. Po 72 hod je aktivita srovnatelná s kontrolním vzorkem. Aktivita enzymu u buněk vystavených působení IVM je po 8 a 24 hod srovnatelná s kontrolním vzorkem, po 72 hod je aktivita enzymu v porovnání s kontrolním vzorkem signifikantně nižší.

6 Diskuze

Léčiva používající se ve veterinární medicíně představují, spolu s humánními léčivými, novou třídu mikropolutantů. Uvolňování těchto kontaminantů do prostředí probíhalo po mnoho desetiletí, ale až teprve nedávno byly vyvinuty metody pro jejich detekci (Snow, et al., 2014). Prostředí je neustále kontaminováno veterinárními léčivými a to buď přímo prostřednictvím ošetřovaných zvířat, nebo nepřímo aplikací hnoje a jiných odpadních produktů na půdu a jejich prosakováním do vody (Piotrowicz-Cieślak, et al., 2012). Veterinární léčiva, stejně jako jiné kontaminanty prostředí, mohou vstupovat do rostliny a stávají se tak pro ně potenciálním nebezpečím. Pokud je rostlina vystavena působení stresových podmínek prostředí, dochází k nadprodukci ROS. Nicméně, rostliny mají proti ROS vyvinuty dobré obranné mechanismy zahrnující antioxidanty a antioxidační enzymy (Tripathy, et al., 2012).

Studii zabývajících se vlivem léčiv na antioxidační enzymy v rostlinách je v porovnání s výzkumy zabývajících se vlivem dalších stresových faktorů (extrémní teplotní podmínky, salinita, nedostatek živin, těžké kovy) daleko méně. Většina studií, která se zabývá vlivem léčiv na aktivitu antioxidačních enzymů v rostlinách, je zaměřena na antibiotika (např. Vilvert, et al., 2016; Wang, et al., 2017; Liu, et al., 2013).

Cílem této práce bylo zjistit, jak vybraná anthelmintika ovlivňují aktivitu antioxidačních enzymů. Rostliny obsahují několik typů antioxidačních enzymů, schopné odstraňovat, neutralizovat nebo eliminovat ROS. Specifická aktivita antioxidačních enzymů CAT, POX, APX, GR, GST, SOD byla měřena na kontrolních buňkách a buňkách infikovaných IVM nebo FEN rostliny *Arabidopsis thaliana*. Experiment byl prováděn na suspenzních kulturách, u nichž je výhoda jednoduché a rychlé kultivace.

Zatím jsou pouze omezené informace o působení anthelmintik na antioxidační enzymy v rostlinách. Studie prováděná Raisová Stuchlíková, et al., (2018), zkoumala vliv dvou benzimidazolových anthelmintik (flubendazol (FLU), fenbendazol) na aktivitu antioxidačních enzymů (CAT, APX, SOD, POX, GST) u suspenzních kultur *Plantago lanceolata*. U obou rostlin (*Arabidopsis thaliana*, *Plantago lanceolata*) nejsou pozorovány žádné signifikantní změny na aktivitu APX po expozici FEN. Také aktivita CAT není u rostlin signifikantně ovlivněna s výjimkou aktivity CAT u *Arabidopsis thaliana* po 24 hod, kdy byla její aktivita nižší. Aktivita dalších enzymů (SOD, POX,

GST) je u obou rostlin rozdílná. Je zajímavé, že aktivita SOD se u *Arabidopsis thaliana* zvýšila po 8 a 24 hod a u *Plantago lanceolata* se naopak aktivita enzymu po 6, 24 a 48 hod snížila. Opačně tomu bylo u GST, kdy se aktivita enzymu u jitrocele po 6 a 24 hod zvýšila a u huseníčku naopak došlo po 72 hod ke snížení aktivity enzymu. Aktivita POX nejví u huseníčku po celou dobu expozice FEN signifikantní změny, naopak u jitrocele je aktivita enzymu nižší.

Efekt anthelmintika ivermektinu na antioxidační enzymy nebyl prozatím u rostlin analyzován. Z výsledků vyplývá, že i ivermektin může ovlivnit antioxidační enzymy. Na GR, GST a SOD má přítomnost ivermektinu inhibiční účinek, naopak u POX a CAT dochází k signifikantnímu nárustu aktivity v přítomnosti ivermektinu. Na aktivitu APX nemá přítomnost IVM, stejně jako přítomnost FEN a FLU, signifikantní efekt.

Z naměřených dat je zřejmé, že testovaná anthelmintika IVM a FEN mají vliv na antioxidační enzymy, což může vést k vyššímu riziku oxidačního poškození rostliny. Tento experiment byl prováděn na modelové rostlině. Pro vyslovení přesnějších závěrů by nicméně bylo dobré, tyto výsledky potvrdit studiiemi na rostlinách, které se přirozeně vyskytují v podmínkách prostředí, kde lze expozici anthelmintik očekávat (pastviny, pole hnojená hnojem).

7 Závěr

V této diplomové práci bylo zjištěno, jak vybraná anthelmintika ovlivňují aktivitu antioxidantních enzymů.

1. Byly připraveny rostlinné kultury *Arabidopsis thaliana*.
2. Byla provedena inkubace suspenzní kultury s vybranými anthelmintiky (FEN, IVM).
3. Vzorčky byly zpracovány a připraveny pro další analýzu.
4. Byla stanovena koncentrace bílkoviny ve vzorcích.
5. Byla změřena aktivita jednotlivých enzymů (POX, CAT, APX, GR, GST, SOD).

8 Seznam zkratek

2, 4-D	kyselina 2, 4- dichlorfenoxyoctová
APX	askorbát peroxidasa
AsA-GSH	askorbát-glutathionový cyklus
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
CBBG	barviva Coomassie Brilliant Blue G-250
CYP	cytochrom P450
DHAR	dehydroaskorbát reduktasa
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	falvinadenindinukleotid
FEN	fenbendazol
FLU	flubendazol
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
GSSG	glutathion disulfid
IVM	ivermektin
MDAR	monodehydroaskorbát reduktasa
NAA	naftalenoctová kyselina
NAD(P)	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
PAPS	3' - fosfoadenosin – 5' - fosfosulfát
POX	peroxidasa
PBS	Phosphate Buffered Saline
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxid dismutasa
WT	wild type, přirozená nemutovaná forma určitého genu či organismu

9 Použitá literatura

- Abhilash, P.C., Jamil, Sarah and Singh, Nandita. 2009.** Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology Advances*. 2009, Vol. 27, 4.
- Almagro, L., et al. 2009.** Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*. 2009, Vol. 60, 2, pp. 377–390.
- Alscher, Ruth Grene, Erturk, Neval and Heath, Lenwood S. 2002.** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2002, Vol. 53, 372.
- Anjum, Naser A., et al. 2016.** Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, Vol. 23, 19, pp. 19002–19029.
- Bártíková, Hana, et al. 2015.** Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug metabolism reviews*. 2015, Vol. 47, 3.
- Bártíková, Hana, Podlipná, Radka and Skálová, Lenka. 2016.** Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*. 2016, Vol. 144, pp. 2290-2301.
- Bonilla, M., et al. 2008.** Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J. Biol. Chem.* 2008, Vol. 283, 26, pp. 17898-17907.
- Boušová, Iva, et al. 2013.** *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha : Karolinum, 2013. 978-80-246-1917-0.
- Boxall, A. B. A., et al. 2002.** *Review of Veterinary Medicines in the Environment*. Bristol : Environment Agency, 2002. 1 85705 780 5.
- Caverzan, Andréia, Casassola, Alice and Brammer, Sandra Patussi. 2016.** Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress. [book auth.] Arun K. Shanker and Chitra Shanker. *Abiotic and biotic stress in plants - recent advances and future perspectives*. s.l. : Rijeka: InTech, 2016, 22.
- Caverzan, Andréia, et al. 2012.** Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*. 2012, Vol. 35, 4.
- Compton, SJ and Jones, CG. 1985.** Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*. 1985, Vol. 151, pp. 369-74.

- Cooke, Andrew S., Morgan, Eric R. and Dungait, Jennifer A.J. 2017.** Modelling the impact of targeted anthelmintic treatment of cattle on dung fauna. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017, Vol. 55, pp. 94-98.
- Cosio, Claudia and Dunand, Christophe. 2009.** Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*. 2009, Vol. 60, 2, pp. 391–408.
- Crump, Andy and Ōmura, Satoshi. 2011.** Ivermectin, ‘Wonder drug’ from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*. 2011, Vol. 87.
- Dat, J., et al. 2000.** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*. 2000, Vol. 57, 2000, pp. 779–795 .
- De Gara, Laura. 2004.** Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2004, Vol. 3, pp. 195–205.
- Delannoy, Étienne, et al. 2004.** Les peroxydases vegetales de classe III. *Acta Botanica Gallica*. 2004, Vol. 151, 4, pp. 353-380.
- Derksen, J.G.M., Rijs, G.B.J. and Jongbloed, R.H. 2004.** Diffuse pollution of surface water by pharmaceutical products. *Water Science and Technology*. 2004, Vol. 49, 3.
- Dixon, David P., Laphorn, Adrian and Edwards, Robert. 2002.** Plant glutathione transferases. *Genome Biology*. 2002, Vol. 3, 3.
- Dixon, David P., Skipsey, Mark and Edwards, Robert. 2010.** Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 2010, Vol. 71, 4.
- Drotar, Annamaire, Phelps, Patricia and Fall, Ray. 1985.** Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*. 1985, Vol. 42, 1, pp. 35 - 40.
- Eva, Csaba, et al. 2014.** Transgenic barley expressing the Arabidopsis AKR4C9 aldo-keto reductase enzyme exhibits enhanced freezing tolerance and regenerative capacity. *South African Journal of Botany*. 2014, Vol. 93, pp. 179-184.
- Foundation, National Science. 2017.** The Genome of Arabidopsis. [Online] 24 březen 2017. [Cited: 2 1 2018.] <https://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/genome.htm#content>.
- Gill, Sarvajeet Singh and Tuteja, Narendra. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, Vol. 48, 12, pp. 909-930.
- Gill, Sarvajeet Singh, et al. 2013.** Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013, Vol. 70, pp. 204-212.

- Gill, Sarvajeet Singh, et al. 2015.** Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, Vol. 22, 14.
- Gong, Haibiao, et al. 2005.** Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro. *Plant Molecular Biology*. 2005, Vol. 57.
- Gupta, Ramesh C. and Milatovic, Dejan. 2014.** Chapter 23 – Insecticides. [book auth.] Ramesh C. Gupta. *Biomarkers in Toxicology*. San Diego : Academic Press, 2014, pp. 389–407.
- Hamdane, Djemel, Zhang, Haoming and Hollenberg, Paul. 2008.** Oxygen Activation by Cytochrome P450 Monooxygenase. *Photosynthesis Research*. 2008, Vol. 98, 1-3.
- Hanzl, M. 2008.** Arabidopsis thaliana - huseníček rolní. [Online] 12 září 2008. [Cited: 1 leden 2018.] <http://www.naturabochemica.cz/arabidopsis-thaliana/>. ISSN 1805-126X.
- Hiraga, Susumu, et al. 2001.** A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*. 2001, Vol. 24, 5, pp. 462–468.
- Horvat, A.J.M., et al. 2012.** Analysis, occurrence and fate of anthelmintic and their transformation product in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*. 2012, Vol. 31.
- Hossain, Mohammad Anwar, et al. 2017.** *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. s.l. : Springer International Publishing, 2017. 978-3-319-66682-2.
- Imahori, Yoshihiro. 2014.** Chapter 14 – Role of Ascorbate Peroxidase in Postharvest Treatments of Horticultural Crops. *Oxidative Damage to Plants*. s.l. : Academic Press, 2014.
- Jancova, Petra, Anzenbacher, Pavel and Anzenbacherova, Eva. 2010.** PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. *Biomedical Papers*. 2010, Vol. 154, 2, pp. 103-116.
- Jouili, Hager, Bouaziz, Houda and El Ferjani, Ezzeddine. 2011.** Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM*. 2011, Vol. 33, 6.
- Kaplan, Ray M. and Vidyashankar, Anand N. 2012.** An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 2012, Vol. 186, 1-2.
- Kaplan, Ray M. 2004.** Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. 2004, Vol. 29, 3.
- Klatte, Stephanie, Schaefer, Hans-Christian and Hempel, Maximilian. 2017.** Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2017, Vol. 5, pp. 61-66.

- Komives, Tamas and Gullner, Gábor. 2005.** Phase 1 Xenobiotic Metabolic Systems in Plants. *z. Naturforsch.* 2005, Vol. 60, pp. 179-185.
- Koornne, Maarten and Meinke, David. 2010.** The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*. 2010, Vol. 61, pp. 909-921.
- Kotyza, Jan, et al. 2009.** LÉČIVA – „NOVÝ“ ENVIROMENTÁLNÍ POLUTANT. *Chemické listy*. 2009, Vol. 103, pp. 540-547 .
- Labrou, Nikolaos E., et al. 2015.** Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015, Vol. 32.
- Lamka, Jiří and Ducháček, Lubomír. 2014.** *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha : Karolinum, 2014. 9788024628226.
- Li, W.C. 2014.** Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*. 2014, Vol. 187, pp. 193-201.
- Liu, Lin, et al. 2013.** Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions. *Ecological Engineering*. 2013, Vol. 53, pp. 138-143.
- Locato, Vittoria, Cimini, Sara and De Gara, Laura. 2013.** Strategies to increase vitamin C in plants: From plant defense perspective to food biofortification. *Frontiers in Plant Science*. 2013, Vol. 4, 152.
- Marrs, Kathleen A. 1996.** THE FUNCTIONS AND REGULATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN PLANTS. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1996, Vol. 47, pp. 127-158.
- Opletalová, Veronika. 2012.** Anthelmintika. [book auth.] Jiří Hartl, et al. *Farmaceutická chemie IV*. Praha : Karolinum, 2012.
- Page, Stephen W. 2008.** Chapter 10 – Antiparasitic drugs. [book auth.] Stephen W Page, et al. *Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition)*. Philadelphia : Elsevier, 2008.
- Papich, Mark G. 2016.** Fenbendazole. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)*. St. Louis : Elsevier, 2016.
- Pflugmacher, Stephan, et al. 2015.** Green Liver Systems® for Water Purification: Using the Phytoremediation Potential of Aquatic Macrophytes for the Removal of Different Cyanobacterial Toxins from Water f. *American Journal of Plant Sciences*. 2015, Vol. 6, pp. 1607-1618.
- Piotrowicz-Cieślak, Agnieszka, Adornas, B. and Nałęcz-Jawecki, G. 2012.** Phytotoxicity of sulfonamide soil pollutants to legume plant species. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2012, Vol. 21, 5, pp. 1310-1314.

- Piterková, Jana, et al. 2005.** Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy*. 2005, Vol. 99, pp. 455 - 466.
- Raisová Stuchlíková, Lucie, et al. 2018.** Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, Vol. 147, pp. 681-687.
- Ribeiro, Carolina W., et al. 2017.** Rice peroxisomal ascorbate peroxidase knockdown affects ROS signaling and triggers early leaf senescence. *Plant Science*. 2017, Vol. 263, pp. 55-65.
- Romero-Puertas, María C., et al. 2006.** Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic. *The new phytologist*. 2006, Vol. 170, 1.
- Ryu, Jang-Ha, et al. 2013.** A Water-Soluble Fenbendazole (FBZ) Formulation for Treating Pinworm Infections in Laboratory Animals. *Current Drug Delivery*. 2013, Vol. 3, 3.
- Sandermann, H. Jr. 1994.** Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics*. 1994, Vol. 4, 5.
- Scandalio, John G. 1993.** Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*. 1993, Vol. 101, 1, pp. 7-12.
- Scott, Nancy E. 2009.** Chapter 93 – Ivermectin Toxicity. [book auth.] Deborah C. Silverstein and Kate Hopper. *Small Animal Critical Care Medicine*. St. Louis : Saunders Elsevier, 2009.
- Sengupta, Debashree, Naik, Dhiraj and Reddy, Attipalli R. 2015.** Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update. *Journal of Plant Physiology*. 2015, Vol. 179, pp. 40-55.
- Shanke, Chitra ed. 2016.** *Abiotic and biotic stress in plants - recent advances and future perspectives*. Rijeka : First published, 2016. 978-953-51-2250-0.
- Sharma, , Iti and Ahmad, Parvaiz. 2014.** Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants. [book auth.] Parvaiz Ahmad. *Oxidative Damage to Plants*. s.l. : Academic Press, 2014, pp. 131–148.
- Shigeto, Jun and Tsutsumi, Yuji. 2016.** Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytologist*. 2016, Vol. 209, 4, pp. 1395–1402.
- Shkryl, Y.N., et al. 2013.** The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Biotechnology*. 2013, Vol. 168, 1, pp. 64-70.

- Skálová, Lenka, et al. 2001.** Effect of ivermectin on activities of cytochrome P450 isoenzymes in mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*). *Chemico-Biological Interactions*. 2001, Vol. 137, 2.
- Snow, Daniel D., et al. 2014.** Detection, Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Agricultural Environments. *Water Environ Res.* 2014, Vol. 87, 10.
- Sosa-Ferrera, Zoraida, Mahugo-Santana, Cristina and Santana-Rodríguez, José Juan. 2013.** Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *BioMed Research International*. 2013, Vol. 2013.
- Soudek, P., et al. 2008.** *Fytoremediace a možnosti zvýšení její účinnosti*. s.l. : Chem. Listy 102, 346–352, 2008.
- Strommer, Judith. 2011.** The plant ADH gene family. *The plant journal*. 2011, Vol. 66, 1, pp. 128-142.
- Tenaglia, Dan. 2007.** *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. *Missouriplants.com*. [Online] 2 červenec 2007. [Cited: 14 duben 2018.]
http://www.missouriplants.com/Whitealt/Arabidopsis_thaliana_page.html.
- Tripathy, Baishnab Charan and Oelmülle, Ralf. 2012.** Reactive oxygen species generation and signaling. *Plant Signaling & Behavior*. 2012, Vol. 7, 12, pp. 1621–1633.
- Ukeda, H., et al. 2002.** Spectrophotometric Assay of Superoxide Anion Formed in Maillard Reaction Based on Highly Water-soluble Tetrazolium Salt. *Anal Sci*. 2002, Vol. 10, pp. 1151-1154.
- Vanacker, Hélène, Carver, Tim L.W. and Foyer, Christine H. 1998.** Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiology*. 1998, Vol. 117, 3, pp. 1103-1114.
- Vaněk, T., et al. 2017.** *Fytoremediace a možnosti její aplikace*. Praha : Středisko společných aktivit AV ČR, 2017. 2464-6245.
- Verma, Shalini and Dubey, R.S. 2003.** Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003, Vol. 164, 4, pp. 645-655.
- Vilvert, Elisa, et al. 2016.** The effect of oxytetracycline on physiological and enzymatic defense responses in aquatic plant species *Egeria densa*, *Azolla caroliniana*, and *Taxiphyllum barbieri*. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2016, Vol. 99, 1, pp. 104-116.
- Wang, Meixian, Zhang, Yuxuan and Guo, Peiyong. 2017.** Effect of florfenicol and thiamphenicol exposure on the photosynthesis and antioxidant system of *Microcystis flos-aquae*. *Aquatic Toxicology*. 2017, Vol. 186, pp. 67-76.

Wilce, Matthew C.J. and Parker, Michael W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1994, Vol. 1205, 1.

Ye, Lingxiang and Zhang, Yuesheng. 2001. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 2001, Vol. 22, 12, pp. 1987-1992.