

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv paracetamolu na obsah sekundárních metabolitů
u lociky seté**

Diplomová práce

Bc. David Čáka

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce PharmDr. Jan Kubeš, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv paracetamolu na obsah sekundárních metabolitů u lociky seté" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.04.2022

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval PharmDr. Janu Kubešovi, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady a poskytnuté materiály.

Vliv paracetamolu na obsah sekundárních metabolitů u lociky seté

Souhrn

Lidská činnost poskytla světu širokou škálu chemických látek, které se buď záměrně nebo náhodou mohou dostat do životního prostředí jako jeho kontaminanty. Jedná se většinou o cizorodé sloučeniny, obecně nazývané jako xenobiotika. Kromě běžných organických polutantů a pesticidů se sem řadí mimo jiné i léčiva a jejich rezidua.

Tyto polutanty, pocházející hlavně z odpadních vod průmyslových zón, ale i domácností nebo farem, se vyskytují v pitné vodě, půdě či sedimentu, kam se dostávají např. vylučováním močí nebo nedostatečným odstraněním během čištění odpadních vod, jsou zodpovědné za chemický stres rostlin, které je absorbují z kontaminované vody nebo půdy. Na rozdíl o působení xenobiotik na lidský organismus nebo zvířata, není oblast o interakcích mezi xenobiotikem a rostlinou (absorpce, transport rostlinou a vliv na metabolické dráhy) tolik prozkoumaná.

Rostliny aktivují své obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu, což vede k produkci proteinů bojujících proti stresu. Je prokázáno, že stresové faktory ovlivňují sekundární metabolismus rostlin a jeho metabolity, které se účastní aklimatizace a adaptace rostlin a vedou ke zmírněnému stresu. Sekundární metabolity např. chrání rostliny před UV-B zářením, mohou pohlcovat volné radikály a snižovat tím oxidační stres, zvýšená akumulace anthokyaninů pak pomáhá k obnově fotosyntetické účinnosti rostlin. Rovněž přispívají ke specifickým pachům, chutím a zbarvením a některé metabolity dokonce i ke komunikaci mezi rostlinami a případnými symbiotickými organismy

Tato diplomová práce se zabývá jak paracetamol, běžně dostupné léčivo volně prodejně v lékárnách, působí na obsah sekundárních metabolitů u rostliny *Lactuca sativa*, komerčně známého jako salát, jedné z nejpěstovanější a nejrozšířenější listové zeleniny na světě.

Klíčová slova: Abiotický stres, *Lactuca sativa*, sekundární metabolismus, paracetamol, polyfenolické látky

Effect of paracetamol on the content of secondary metabolism of *Lactuca sativa*

Summary

Human activity has provided the world with a wide range of chemicals that, either intentionally or accidentally, can enter the environment as its contaminants. These are mostly foreign compounds, generally referred to as xenobiotics. In addition to common organic pollutants and pesticides, this includes drugs and their residues.

These pollutants, originating mainly from the wastewater of industrial zones, but also from households or farms, occur in drinking water, soil or sediment, where they enter, for example, by urine excretion or insufficient disposal during wastewater treatment, are responsible for chemical stress of plants that they are absorbed from contaminated water or soil. Unlike the effects of xenobiotics on humans or animals, the area of xenobiotic-plant interactions (absorption, transport by the plant and effects on metabolic pathways) has not been much studied.

Plants activate their defense mechanisms against oxidative stress, which leads to the production of anti-stress proteins. Stress factors have been shown to affect plant secondary metabolism and its metabolites, which are involved in plant acclimatization and adaptation and lead to alleviated stress. Secondary metabolites, for example, protect plants from UV-B radiation, can absorb free radicals and thus reduce oxidative stress, and increased accumulation of anthocyanins then helps to restore the photosynthetic efficiency of plants. They also contribute to specific odors, tastes and colors and some metabolites even to communication between plants and possible symbiotic organisms.

This thesis deals with how paracetamol, a commonly available over-the-counter drug, affects the content of secondary metabolites in *Lactuca sativa*, commercially known as lettuce, one of the most widely grown and widespread leafy vegetables in the world.

Keywords: abiotic stress, *Lactuca sativa*, secondary metabolism, paracetamol, polyphenols

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Botanická charakteristika lociky seté	10
3.1.1	Původ a pěstování	10
3.1.2	Obsah živin	11
3.1.3	Bioaktivní sloučeniny	12
3.2	Sekundární metabolismus rostlin	13
3.2.1	Polyfenoly	14
3.2.1.1	Flavonoidy	14
3.2.1.2	Jiné fenolické látky	16
3.2.2	Terpeny	17
3.2.3	Steroidy	18
3.3	Stres rostlin	19
3.3.1	Abiotický stres	20
3.3.1.1	Sucho	22
3.3.1.2	Zasolení.....	23
3.3.1.3	Teplota	23
3.3.1.4	Světlo a záření.....	25
3.3.1.5	Chemický stres.....	25
3.4	Xenobiotika	26
3.4.1	Léčiva.....	27
3.4.2	Paracetamol.....	28
4	Metodika	30
4.1	Použité materiály a přístroje	30
4.1.1	Výchozí látky a použitá činidla.....	30
4.1.2	Přístrojové vybavení	30
4.1.3	Rostlinný materiál.....	31
4.2	Použité metody	31
4.2.1	Příprava extraktů	31
4.2.2	Stanovení celkových flavonoidů.....	31
4.2.3	Stanovení celkových fenolů.....	32
4.2.4	Stanovení celkových fenolických kyselin.....	32
4.2.5	Stanovení celkového obsahu anthokyaninů	32
4.2.6	Stanovení antioxidační kapacity	33
4.2.7	Vychytávání peroxidu vodíku.....	33

4.2.8	Statistická analýza.....	33
5	Výsledky.....	34
5.1	Aplikace paracetamolu zálivkou.....	34
5.1.1	Stanovení celkových flavonoidů.....	34
5.1.2	Stanovení celkových fenolů.....	36
5.1.3	Stanovení celkových fenolických kyselin.....	37
5.1.4	Stanovení celkových anthokyaninů.....	39
5.1.5	Stanovení antioxidační aktivity.....	40
5.1.6	Vychytávání peroxidu vodíku.....	42
5.2	Aplikace paracetamolu postříkem.....	43
5.2.1	Stanovení celkových flavonoidů.....	43
5.2.2	Stanovení celkových fenolů.....	44
5.2.3	Stanovení celkových fenolických kyselin.....	44
5.2.4	Stanovení celkového obsahu anthokyaninů.....	45
5.2.5	Stanovení antioxidační aktivity.....	46
5.2.6	Vychytávání peroxidu vodíku.....	46
5.3	Analýza hlavních komponent.....	47
6	Diskuse.....	49
6.1	Porovnání mezi chronickou, akutní zálivkou a postříkem.....	49
6.1.1	Stanovení celkových flavonoidů (TFC).....	49
6.1.2	Stanovení celkových fenolů (TPC).....	50
6.1.3	Stanovení celkových fenolických kyselin (SAC).....	51
6.1.4	Stanovení antioxidační aktivity (PAP).....	51
6.1.5	Stanovení anthokyaninů.....	52
6.1.6	Vychytávání peroxidu vodíku.....	52
7	Závěr.....	54
8	Literatura.....	55
9	Seznam obrázků.....	63

1 Úvod

Locika setá (*Lactuca sativa* L.), komerčně známa jako salát, je jednou z nejrozšířenějších listových zelenin na světě. Používá se výhradně jako čerstvá zelenina a pěstuje se v mnoha zemích po celém světě (Lebeda et al. 2006; Lephatsi et al. 2021).

Mezi hlavní bioaktivní produkty rostlin, včetně těch konzumních, jakou je právě locika setá, se řadí fenolické sloučeniny vznikající v rámci sekundárního metabolismu, které jsou všudypřítomné v rostlinných orgánech a ovlivňují sensorické a nutriční vlastnosti potravin rostlinného původu (Slatnar et al. 2012). Tyto metabolity byly a jsou, díky svým biologickým účinkům, využívány v rámci tradiční medicíny. Dále jsou používány jako významné sloučeniny při výrobě léčiv, potravinářských přídatných látek, příchutí, parfémů, kosmetických prostředků, nutraceutik a průmyslově důležitých biochemických látek, díky tomu, že u nich byly prokázány příznivé účinky proti oxidativnímu stresu, zánětům, rakovině, cukrovce nebo neurodegeneraci související s věkem (Seeram et al. 2006; Cuevas-Rodríguez et al. 2010; Ramakrishna & Ravishankar 2011; You et al. 2012; Kim et al. 2016).

V přírodě mají sekundární metabolity pro samotnou rostlinu důležitou roli v jejím vztahu k životnímu prostředí. Rostliny je často mohou využívat k ochraně proti býložravcům nebo patogenům, ale mohou poskytovat i ochranu před vnějšími abiotickými stresy, kde hrají důležitou úlohu při adaptaci na stresové podmínky (BENNETT & WALLSGROVE 1994), či přispívají ke specifickým pachům, chutím a zbarvením a fungují jako atraktanty (Ramakrishna & Ravishankar 2011). Některé rostliny využívají sekundární metabolity dokonce i ke komunikaci mezi rostlinami a případnými symbiotickými organismy (Yang et al. 2018).

V přírodě se stres obecně nevyskytuje izolovaně a mnoho stresových činitelů se ve vzájemném působení může vyrušit nebo podpořit. V reakci na tyto stresové signály, které se navzájem kříží, příroda vyvinula různé cesty, jak s nimi bojovat a tolerovat je. Je prokázáno, že stresové faktory ovlivňují produkci sekundárních metabolitů a celkový růst rostlin. Tyto mechanismy ve spolupráci se sekundárními metabolity vedou ke zmírnění stresu a adaptaci rostlin (Mahajan & Tuteja 2005). Abiotický stres je hlavní příčinou výrazného snížení výnosu plodin po celém světě až o 50 %, a tím ohrožují udržitelnost zemědělské produkce. Mezi hlavní abiotické stresové faktory se řadí teplota, salinita, nedostatek nebo přebytek vody, světlo nebo jiné typy záření a chemický stres. (Tuteja & Sopory 2008; Ramakrishna & Ravishankar 2011).

Právě pesticidy nebo léčivé a pomocné látky a jejich rezidua, které se pohybují v koncentracích mezi ng/l až µg/l mohou způsobovat chemický stres, který je v posledních letech zkoumán. Rizika těchto chemikálií pro člověka, zvířata a vodní ekosystém je dobře známý, ale i informace o interakcích rostlina-léčivá látka a metabolických drah zatím nejsou tolik prozkoumané. Nicméně bylo prokázáno, že rostliny absorbují xenobiotika z kontaminované půdy a vody (Ternes et al. 2007; Bartha et al. 2010; Leitão et al. 2021a).

Tato diplomová práce se zabývá jak chemický stres navozený různými koncentracemi paracetamolu, ovlivňuje obsah sekundárních metabolitů v rostlinách *L. sativa*.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je vyhodnotit obsah celkových fenolů, celkových flavonoidů a fenolických kyselin v sušině rostliny *Lactuca sativa*, která byla pěstována v zemině kontaminované paracetamolem o vzrůstající koncentraci od 5 μM po 5 mM.

Z uvedených cílů vyplývají následující hypotézy:

- a) s ohledem na předcházející experimenty bude mít paracetamol vliv na obsah sekundárních metabolitů
- b) obsah metabolitů se bude lišit v závislosti na koncentraci použitého paracetamolu a jeho dávkování v akutní nebo chronické zálivce.

3 Literární rešerše

3.1 Botanická charakteristika lociky seté

Locika setá (*Lactuca sativa* L.) je nejvýznamnější plodinou ve skupině listové zeleniny. Mezi největší producenty patří v Asii Čína a Japonsko, v Evropě Španělsko a Itálie. Rod *Lactuca* se řadí do kmene *Lactuceae*, podčeledi *Cichoriodeae*, čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*) a třídy dvouděložné (*Rosopsida*). Přesné vymezení rodu bývá problematické a celkový počet taxonů se liší autor od autora. Vyznačuje se značnou genetickou a morfologickou variabilitou. Locika setá zahrnuje sedm hlavních kultivarů, které se liší především fenotypově, obvykle označovány jako morfotypy (Křístková et al. 2008).

Locika setá je jednoletá bylina s tenkým kohoutkovým kořenem a přímou lodyhou vysokou 30-100 cm, která je v horní části rozvětvená. Lodyha je protkána specializovanými buňkami zvanými mléčnice, které při poškození pletiv vylučují bílý latex. Listy jsou spirálovitě uspořádané a uprostřed tvoří růžici nebo hlávku. Tvar listů je podlouhlý až eliptický, okrouhlý až trojúhelníkový. Listy jsou nedělené až zpeřené. Okraj listu je celokrajný až zubatý, často kudrnatý.

Květenství (hlava) je složeno ze sedmi až patnácti žlutých ligulů (kvítků). Hlavu tvoří hustě listenová lata. Zákrov je deset až patnáct milimetrů dlouhý a válcovitý, zákrovní listeny jsou široce až úzce kopinaté, světle zelené s bílými okraji. Plodem je nažka s pěti až sedmi setózovými žebry na každé straně, zobákem a bílým chmýrem. Jeho délka činí šest až osm milimetrů a má bílou až krémovou barvu. Plod je diploidní se základním počtem chromozomů $n=9$ (Křístková et al. 2008).

3.1.1 Původ a pěstování

Pěstovaný salát je považován za jednu z nejdůležitějších rostlin ve skupině listových zelenin. Používá se výhradně jako čerstvá zelenina v salátech, ale některé formy jsou také vhodné k tepelné úpravě. Salát se pěstuje v mnoha zemích po celém světě, zvláště oblíbený je v Asii, Severní Americe a Evropě. Je to rovněž častý druh při domácím pěstování zeleniny (Lebeda et al. 2006; Křístková et al. 2008).

Současná locika setá pochází z divoké lociky kompasové (*Lactuca serriola*, L.), u které není jasné její prvotní domestikace. Kultivovaný salát se vyznačuje značnou genetickou diverzitou vyplývající z jeho původu, dlouhé historie šlechtění a složitého procesu domestikace (Lebeda et al. 2021). Podle Damania et al. (1998) může být původním centrem pěstování Egypt s odhadovaným datem domestikace salátu 7 000 let před naším letopočtem, díky vyobrazení jeho dlouholisté formy na hrobových malbách. Oproti tomu Zhang et al. (2017) posunul prvotní domestikaci salátu ještě o více jak 3500 let dále v úrodném údolí púlmésice na Blízkém východě. Nedávná studie ale naznačila, že centrem domestikace pěstovaného salátu byl Kavkaz (Wei et al. 2021).

Ačkoli různé skupiny výzkumníků v průběhu let navrhovali různé klasifikační systémy, neexistuje dnes žádný standardizovaný klasifikační systém. Salát se pěstuje v odlišných barvách a velikostech, a díky této rozmanitosti ho lze rozřadit dle typů. Typ je skupina kultivarů, které jsou morfologicky podobné, ty lze rozdělit na podtypy, které sdílejí více

morfologických a genetických podobností. Kultivar je odrůda vybraná pro požadované vlastnosti pro kultivaci a odrůda je taxonomická kategorie pod druhy a poddruhy. Nejrozšířenějším druhem lociky seté je salát hlávkový (*Lactuca sativa* var. *capitata*) (Kim et al. 2016).

Pěstování salátu není příliš náročné substrát. Vhodné jsou pro něj písčité až hlinité půdy a vzhledem k tomu, že salát nevyžaduje přímé organické hnojivo je vhodnou předplodinou pěstebního postupu. Salát není náročný na zavlažování, díky svým kořenům dokáže čerpat vodu i z hlubších vrstev půdy, a proto není při jeho pěstování ani třeba velké závlivky. Jarní produkce, na rozdíl od podzimní a letní, nevyžaduje téměř žádné zavlažování. Vše taky záleží na srážkách během pěstovaného období. Salát se sklízí při hmotnosti 400 až 600 gramů (PETŘÍKOVÁ 2006; Šarapatka 2007; Koudela & Petříková 2008).

Šlechtění salátu je zaměřené především na různé morfologické znaky a odolnost vůči škůdcům a chorobám. Tato oblast zaznamenala v posledních letech pokrok. Existují odrůdy odolné vůči mšicím, většina nových odrůd je odolnější nejen vůči plísním, ale i proti virovým chorobám (Šarapatka 2007).

Pěstební plocha pro salát hlávkový dosáhla maxima v roce 2017, od kterého měla sestupnou tendenci až do roku 2021, kdy došlo ke zvýšení osevni plochy o 20 ha (Tabulka 1). Rovněž sklizeň dosáhla maxima v roce 2017 a po velkém propadu v roce 2018 má opět v následujících letech vzestupnou tendenci (Tabulka 1). Spotřeba salátu však už několik let stagnuje okolo průměru 2,4 kg/obyv./rok.

Tabulka 1 - Přehled základních statistických parametrů u salátu hlávkového v letech 2016 až 2021 pro Českou republiku. Zdroj eagri.cz

Salát	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Osevni plocha (ha)	152	589	506	452	451	479
Sklizeň (t)	2 984	22 986	11 955	16 259	16 259	16 439
Spotřeba (kg/obyv./rok)	2,0	2,4	2,5	2,4	2,4	-
Dovoz (t)	-	6 924	7 674	7 763	5 024 ¹	-

3.1.2 Obsah živin

Přestože je salát běžně konzumovanou zeleninou, nebyl považován za nutričně významnou plodinu, především kvůli vysokému obsahu vody. Obsah živin v salátu je závislý na podmínkách pěstování, konkrétně na teplotě, výživě a způsobu hnojení, zavlažování a v neposlední řadě na kultivaru (Koudela & Petříková 2008).

Vzhledem k tomu, že se salát konzumuje většinou syrový, zachovává si na rozdíl od tepelně zpracované zeleniny více živin. Celkový obsah kalorií i tuku je velmi nízký, nicméně salát obsahuje i polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), mezi které patří kyselina linolová a kyselina linolenová, které jsou obě esenciální. Celkový obsah PUFA se v salátu pohybuje

¹ Období od 1.1.-31.8.2020

mezi 0,7 až 1,6 mg/g, přičemž dospělý člověk potřebuje přijmout 12-17 g/den kyseliny linolenové a 1,1-1,6 g/den kyseliny linolové. Salát také poskytuje sacharidy se sníženou stravitelností, a tím i nižším kalorickým obsahem. Salát je velmi bohatý zdroj vlákniny a uvádí se, že sto gramů čerstvého salátu poskytne až 10 % doporučené denní dávky vlákniny pro dospělého člověka. Salát také není bohatý na poslední makroživinu, bílkoviny. Z mikroživin je nejvýznamnější obsah železa, draslíku a vitamínů C a B9 (Tabulka 2) (Křístková et al. 2008; Kim et al. 2016).

Tabulka 2 - Podrobný popis makroživin a mikroživin obsažených ve 100 g jedlé části salátu hlávkového. Zdroj Nzíp.cz

Látky obsažené v hlávkovém salátu	Na 100 g jedlé části	Látky obsažené v hlávkovém salátu	Na 100 g jedlé části
Energie (kcal)	11	Železo (mg)	0,3
Tuky (g)	0,2	Vitamin A (µg)	187
Bílkoviny (g)	1,2	Vitamin B1 (mg)	0,06
Sacharidy (g)	1,1	Vitamin B2 (mg)	0,08
Vláknina (g)	1,4	Vitamin B3 (mg)	0,3
Draslík (mg)	172	Vitamin B6 (mg)	0,06
Vápník (mg)	20	Vitamin C (mg)	13
Hořčík (mg)	9	Vitamin E (mg)	0,6

3.1.3 Bioaktivní sloučeniny

Mezi hlavní bioaktivní látky rostlin se řadí fenolické sloučeniny, produkty sekundárního metabolismu, které jsou všudypřítomné v rostlinných orgánech a ovlivňují senzorycké a nutriční vlastnosti potravin. Díky jejich antioxidační aktivitě, kterou mohou mít i větší než např. vitamin C, byly u nich prokázány příznivé účinky proti oxidativnímu stresu, zánětům, rakovině, cukrovce nebo neurodegeneraci související s věkem (Seeram et al. 2006; Cuevas-Rodríguez et al. 2010; Slatnar et al. 2012; You et al. 2012; Kim et al. 2016).

U lociky seté jsou uváděny jako hlavní podskupiny fenolové kyseliny a flavonoidy. Největší zastoupení u salátu z fenolových kyselin mají kyselina kávová, kyselina chlorogenová a jejich deriváty. Celkový obsah fenolových kyselin měřený jako obsah derivátů kyseliny kávové se pohybuje mezi 0,2-2,0 mg/g v sušině. U červených variant salátu je pak toto množství vyšší a stejně tak obsah flavonoidů. Z měření provedených Llorach et al. (2008) byly v salátech identifikovány hlavně flavonoidy např. flavonoly kvercetin a kaempferol, anhtokyaniny a flavon luteolin (Zhao et al. 2007; Llorach et al. 2008; Kim et al. 2016).

Vyšší obsah celkových fenolů u červených odrůd ve srovnání se zelenými může být tedy způsobeno jak fenolickými kyselinami (hlavně kyselinou kávovou a jejími deriváty), tak flavonoly, které jsou převládající složkou, zatímco u zelených variant jsou hlavní složkou fenolové kyseliny. Dále pak mohou být zodpovědné anthokyaniny, které způsobují červené zbarvení u těchto variant. Celkově studie ukázaly, že hlávkový salát poskytuje nejen

rozmanitost bioaktivních sloučenin, ale také jejich různá množství mezi kultivary salátu (Llorach et al. 2008; Kim et al. 2016).

3.2 Sekundární metabolismus rostlin

Metabolismus rostlin je rozdělen na primární a sekundární podle jejich biosyntetické dráhy a funkce. Většina sekundárních metabolitů vzniká syntézou z primárních metabolitů (aminokyseliny, sacharidy, lipidy). Biosyntéza primárních metabolitů hraje zásadní roli pro život rostliny (růst, reprodukce, metabolismus). Naopak sekundární metabolismus je definován jako termín produkci molekul, které nejsou nezbytné pro přežití organismu (Larson 1988; Alvarez 2014; Yang et al. 2018).

V přírodě sekundární metabolity hrají důležitou roli ve vztahu k životnímu prostředí. Jsou klíčovými sloučeninami pro interakci rostlin s okolím při adaptaci na biotické i abiotické stresové podmínky (Yang et al. 2018). Rostliny je využívají k ochraně proti býložravcům nebo patogenům, ale mohou poskytovat i ochranu před dalšími stresy z prostředí (BENNETT & WALLSGROVE 1994), či přispívají ke specifickým pachům, chutím a zbarvení (Ramakrishna & Ravishankar 2011). Některé rostliny využívají sekundární metabolity dokonce i ke komunikaci mezi rostlinami a případnými symbiotickými organismy (Yang et al. 2018). Sekundární metabolity se hromadí v malých množstvích ve specializovaných buňkách během specifických vývojových stádiích rostlin nebo během stresu, kdy jsou syntetizovány v reakci na expozici některých biotických nebo abiotických faktorů (Seigler 1998; Alvarez 2014).

Rostlinné sekundární metabolity byly díky své biologické aktivitě využívány jako důležitá součást tradiční medicíny. Dále jsou významným zdrojem pro výrobu farmaceutik, potravinářských přídatných látek, příchutí, parfémů, kosmetických prostředků, nutraceutik a průmyslově důležitých biochemických látek (Ramakrishna & Ravishankar 2011; Yang et al. 2018). Výtěžky těchto sloučenin z volně rostoucích rostlin jsou však často malé (méně než 1 % sušiny) a extrakce a čištění časově náročné. Navíc obsah závisí na fyziologickém a vývojovém stádiu rostliny (Ramachandra Rao & Ravishankar 2002). Biosyntézu a akumulaci sekundárních metabolitů mohou ovlivnit různé genetické, ontogenetické, morfologické a environmentální faktory. Akumulace je silně závislá na různých faktorech prostředí, jako je teplota, světlo, půdní voda, složení půdy nebo salinita. Sekundární metabolity mohou být postupně generovány v reakci na environmentální stres, a proto je sekundární metabolismus považován za chování rostliny, které je částečně schopností adaptace a přežití v reakci na podněty z prostředí během života a slouží k navázání vztahů mezi rostlinami a jinými mikroorganismy (Seigler 1998; Goyal et al. 2012; Yang et al. 2018).

Sekundární metabolity mají různou strukturu a lze je rozdělit do čtyř základních skupin – polyfenoly, alkaloidy, terpeny a steroidy. Polyfenoly, steroidy a terpenoidy vykazují kromě svých specifických biologických aktivit, společnou antioxidační a protizánětlivou aktivitu. Alkaloidy jsou pak skupina, která má mimo jiné, řadu účinků na nervovou soustavu (BENNETT & WALLSGROVE 1994).

3.2.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou sekundární metabolity produkované vyššími rostlinami, které jsou obsaženy v ovoci, zelenině, obilovinách, kávě nebo čaji (Daglia 2012). Flavonoidy, jedna ze skupin polyfenolů, se stala nejprozkoumanější skupinou rostlinných polyfenolů. Některé flavonoidy jako například kvercetin se nacházejí prakticky ve všech rostlinných produktech, jiné jsou specifické pro některé druhy, například flavanoly v citrusových plodech (Manach et al. 2004). Jejich pravidelná konzumace je spojena se sníženým rizikem řady onemocnění. Přičítají se jim antioxidační, antialergické, protizánětlivé, protirakovinné, antivirové a antibakteriální účinky. Mezi polyfenoly, které jsou taktéž přítomny v rostlinných pletivech jako řazený i lignany nebo třísloviny. Podle Manach et al. (2004) jsou polyfenoly obecně považovány za antioxidanty působící proti volným radikálům a pomáhají tlumit proces přirozeného stárnutí, Parkinsonovu a Alzheimerovu chorobu. Jejich účinky závisí na spotřebovaném množství a na jejich biologické dostupnosti. Polyfenoly jsou pak v těle metabolizovány střevní mikroflórou a střevními a jaterními enzymy (Alvarez 2014).

Po chemické stránce se jedná o aromatické sloučeniny s jednou nebo více hydroxylovými skupinami. Chemická struktura může být různorodá – od jednodušších molekul tvořených jedním aromatickým kruhem až po polymerní sloučeniny typu kondenzovaných tříslovin. Tyto sloučeniny vychází z fenylalaninu a jsou často také nazývány fenylpropanoidy. Většina fenolických sloučenin se vytváří v rámci fenylpropanoidové dráhy, která je základem tolerance abiotického stresu za působení enzymu fenylalanin amoniak-lyázy (PAL) (Chen et al. 2020).

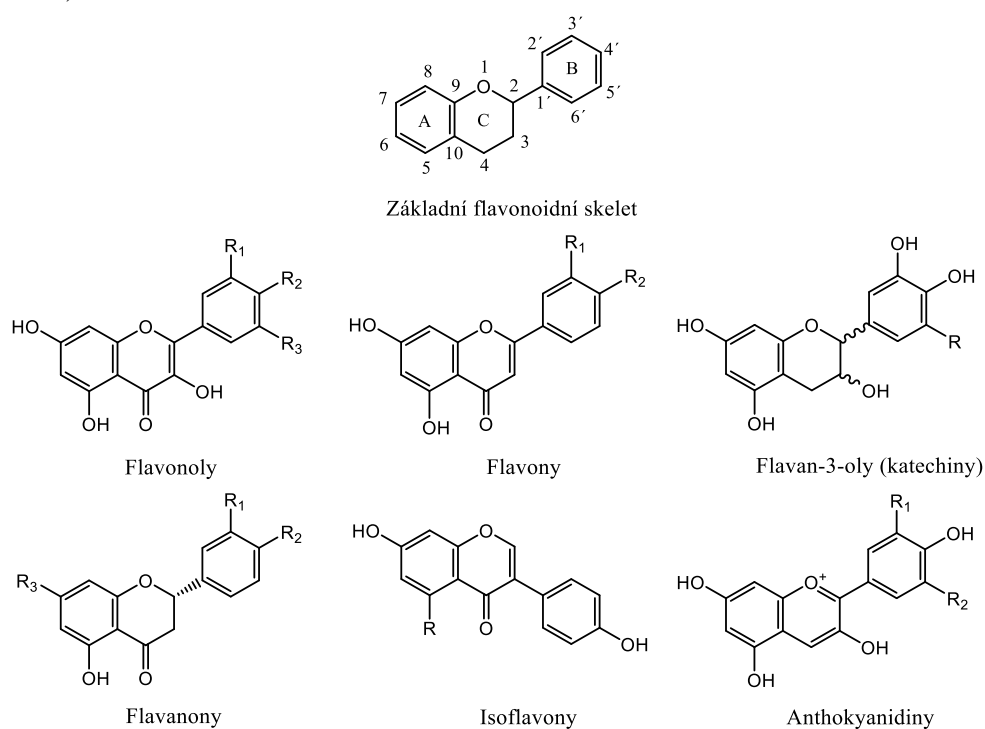
Základem biosyntézy fenolických sloučenin je vazba erythro-4-fosfátu s fosfoenolpyruvátem (PEP). Touto cestou, jinak nazývanou jako šikimátová dráha, vznikají přes meziprodukty hydrogensikimát a šikimát, aminokyseliny fenylalanin a tyrosin. Fenylalanin je pak výchozí molekulou fenylpropanoidové dráhy, která dává vzniknout více než 8 000 aromatickým sloučeninám. První tři kroky této dráhy tvoří reakce obecné fenylpropanoidové dráhy a tvoří prekurzory pro další metabolity. Z fenylalaninu je za pomoci PAL odštěpena dusíkatá skupina za vzniku kyseliny skořicové, která pak pomocí enzymu cinnamát-4-hydroxylázy (C4H) poskytne kyselinu *p*-kumarovou. Posledním krokem je přeměna této kyseliny na kumaroyl-koenzym A za pomoci enzymu 4-kumarát-CoA ligázy. Po této společné cestě se metabolismus větví na různé podskupiny metabolitů např. dráha flavonoidní, ligninová a další. Někteří zástupci této skupiny mají strukturální funkci (např. lignin zpevňující buněčné stěny), jiní se podílejí na obraně rostlin (např. kumarin), opylování, ochraně proti UV záření a vývoji semen, nebo se účastní na kontrole růstu rostliny (Alvarez 2014; Sharma et al. 2019; Dong & Lin 2021).

3.2.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy obsahují běžnou uhlíkovou kostru difenylpropanů, dva benzenové kruhy spojené lineárním řetězcem. Bylo identifikováno přes 4000 flavonoidů v ovoci, zelenině a různých nápojích. Flavonoidy mohou být dále rozdělené v závislosti podle přítomnosti dvojně vazby pyranového kruhu, substituentů a polohy fenylu na flavanoly, flavony, flavanony, flavanoly, anthokyanidiny a isoflavony (Obrázek 1) (Daglia 2012).

Tyto látky se často nacházejí ve vakuole buněk a jsou zodpovědné za barvu většiny květů a plodů, fungují jako opylovací atraktanty (pelargonidin, kyanidin, delphinidin), chrání rostliny před UV-B zářením (kaempferol), popř. působí jako atraktanty pro hmyz (isokvercetin) nebo naopak býložravce odpuzují (proanthokyanidiny). Některé z nich (apigenin, luteolin nebo isoflavony daidzein a genistein) se také účastní jako signální molekuly v rámci symbiózy bobovitých rostlin a bakterií rodu *Rhizobium*. Mnoho flavonoidů je syntetizováno na základě stresových podnětů, jako jsou zranění, sucho, vystavení těžkým kovům a nedostatek živin. Flavonoidy, zejména flavonoly a flavanoly, působí jako antioxidanty při ochraně rostlin před oxidačním stresem (Alvarez 2014).

Během posledních dvou desetiletí se flavonoidy staly populární jako potravinové doplňky. Jejich používání prudce vzrostlo, což vedlo k prozkoumávání jejich farmakokinetiky a metabolismu a staly se zároveň nejprozkoumanější skupinou rostlinných polyfenolů (Teles et al. 2018).



Obrázek 1 - Rozdělení jednotlivých tříd flavonoidů a jejich chemické struktury.

Flavanoly tvoří velmi komplexní skupinu polyfenolů v rozsahu od monomerních flavan-3-olů až po polymerní prokyanidiny známé jako kondenzované trísloviny. Flavanoly najdeme i ve slupkách nebo semenech ovoce a zeleniny, které se často při konzumaci nebo zpracování odstraňují, čímž je také omezen jejich příjem. Je potvrzeno, že flavanoly mohou stimulovat hladiny oxidu dusnatého v krvi kuřáků a zvrátit některé narušené funkce cév související s kouřením (Brodowska 2017). Nejvýznamnějším zástupcem jsou katechiny, kdy hlavními zdroji katechinu jsou zelený a černý čaj, červené víno, čokoláda, meruňky, jablka, broskve, červené maliny a ostružiny. Katechin zabraňuje oxidaci proteinů díky své schopnosti pohlcovat volné radikály a snižovat tím oxidační stres (Manach et al. 2004). Účinnost flavonolů jako antioxidantů většinou závisí na jejich chemické struktuře. Nejdůležitějšími složkami účinku tvoří tři strukturní atributy: katecholová struktura v kruhu B, které funguje jako cílové místo pro radikály; dvojná vazba mezi C2 a C3 v konjugaci s 4-

keto skupinou, které jsou zodpovědné za delokalizaci elektronů z kruhu B a další přítomnost hydroxylových skupin v polohách 3- a 5- pro maximální potenciál vychytávání radikálů.

Anthokyanidiny jsou skupinou přírodních pigmentů, které ovlivňují červené, modré a fialové zbarvení přítomné v mnoha plodech (např. černý rybíz nebo borůvky). Anthokyanidiny hrají zásadní roli při kardiovaskulárních onemocněních, rozkladu cholesterolu a zrakové ostrosti. K nejčastějším zástupcům patří malvidin, petunidin, kyanidin a delphinidin (Brodowska 2017).

Flavanony jsou fenolické látky, které se vyskytují ve všech nadzemních i podzemních částech rostlin. Jejich antioxidační aktivita závisí na počtu a prostorovém umístění fenolických -OH skupin. Flavanony vykazují i protizánětlivé, protirakovinné a antivirové účinky. Nachází se hlavně v citrusech např. hesperidin v citronu nebo naringenin v grepfruitu (Manach et al. 2004).

Isoflavony na rozdíl od ostatních tříd mají menší výskyt v rostlinách, kdy jsou uváděny jako typické metabolity čeledi *Fabaceae*. Hrají velkou roli při tvorbě fytoalexinů, tj. nízkomolekulárních sloučenin syntetizovaných a akumulovaných v rostlinách během stresu a vyvolaném např. útokem mikrobů. Tyto aktivní obranné látky mají fungistatické, antibakteriální, antivirové a antioxidační vlastnosti. Isoflavony se liší navázáním jejich B-kruhu na C3 místo uhlíku C2. S touto strukturální změnou souvisí i jejich větší fytoestrogenní aktivita. Isoflavonoidy hrají mnoho rolí v interakcích rostlina-mikrob, včetně symbiozy rhizobia-luštěniny a obranných reakcí. Nejznámější isoflavon je daidzein v sóji (Dakora & Phillips 1996; Rípodas et al. 2013).

Flavony se řadí mezi nejpočetnější podskupinu flavonoidů. Jsou distribuovány také téměř ve všech rostlinných pletivech. Jejich různorodá role při interakcích s jinými organismy umožňuje jejich uplatnění ve spoustě odvětví např. v ekologii, zemědělství nebo lidské výživě a farmakologii. Při interakcích rostlin s hmyzem mohou být flavony použity jako pigmenty v modrokvětvých rostlinách, čímž přispívají k přitažlivosti opylovačů. Kromě účinnosti jako atraktanty, mohou flavony působit i naopak, např. potlačit vývoj zavíječe kukuřičného. Tyto procesy mohou být velmi často zaměřeny také proti jiným škůdcům (Martens & Mithöfer 2005).

3.2.1.2 Jiné fenolické látky

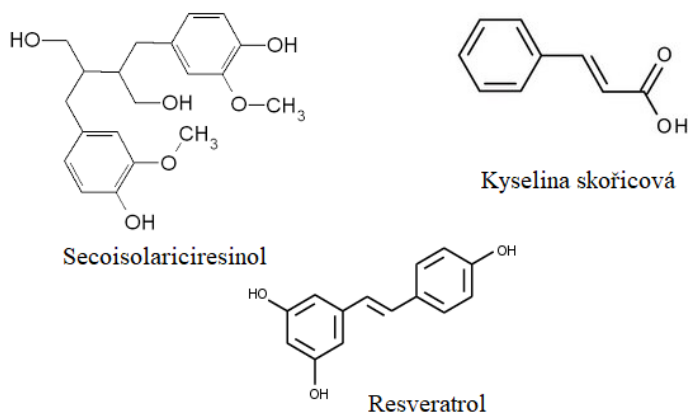
Mezi další látky fenolického charakteru, které ale nemají flavonoidní strukturu se řadí fenolové kyseliny, tedy deriváty kyseliny benzoové nebo kyseliny skořicové, dále stilbeny a lignany (Obrázek 2) (Manach et al. 2004).

Fenolové kyseliny jsou obvykle zastoupené v čaji, kávě a některých červených generativních i vegetativních orgánech rostlin jako jsou maliny nebo ředkvičky. Nachází se, jak volné, tak konjugované s estery, ethery a další řadou sloučenin (jednoduché cukry, organické kyseliny). V rostlinách zajišťují ochranu před UV zářením a býložravci a ovlivňují interakce mezi opylovači a rostlinou. Mezi nejvýznamnější zástupce patří kyselina kávová nebo kyselina skořicová (Abotaleb et al. 2020).

Lignany jsou tvořené dvěma fenylpropanovými jednotkami. Jsou součástí stěn rostlinných buněk a vyskytují se například v semenech rostlin. Zajišťují ochranu proti

patogenům nebo se účastní při kontrole růstu rostlin. Nejbohatší zdrojem jsou lněná semínka (BENNETT & WALLSGROVE 1994; Alvarez 2014).

Stilbeny se vyskytují v lidské stravě v menším množství, obsahuje je hlavně víno. Jedná se o malou skupinu fenolických metabolitů, které se účastní obrany rostlin. Nejvýznamnějším stilbenem je resveratrol, který vzniká při reakci na stres způsobený zraněním nebo napadením patogenem. Při výzkumu byly prokázány jejich antikarcinogenní účinky a resveratrol je považován za prospěšný proti koronárnímu onemocnění u lidí pro svou antioxidační aktivitu a podobně jako isoflavony má i fytoestrogenní účinek (Manach et al. 2004; Alvarez 2014).



Obrázek 2 - Příklady zástupců dalších fenolických látek.

3.2.2 Terpeny

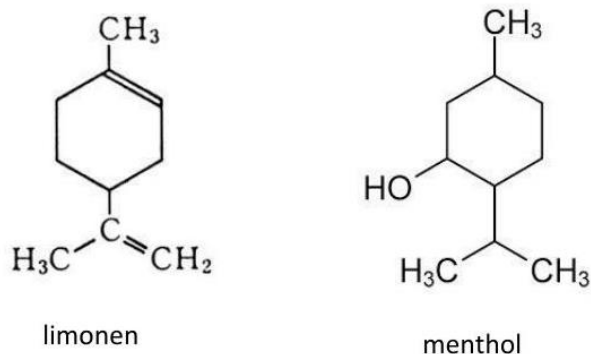
Jedná se o rozsáhlou skupinu odvozenou od opakující se rozvětvené jednotky izoprenu (2-methylbuta-1,3-dienu). Podle počtu pěti-uhlíkových jednotek se dělí dále na hemiterpeny (C5), monoterpeny (C10), seskviterpeny (C15), diterpeny (C20), triterpeny (C30), tetraterpeny (C40) a polyterpeny (přes C80) a většina terpenů má cyklické formy. Obecně platí, že seskviterpeny, triterpeny a polyterpeny vznikají v cytosolu a endoplazmatickém retikulu, zatímco ostatní skupiny v plastidech. Rostliny pak produkují celou škálu terpenů ve specializovaných strukturách jako jsou žláznaté trichomy (Goyal et al. 2012; Alvarez 2014).

Mezi terpeny se řadí silice, které jsou tvořeny směsí monoterpenů. Patří mezi vonné těkavé sloučeniny s nízkou teplotou varu, které při poškození rostlin vytékají na povrch. Na vzduchu se mění na pryskyřice, které působí ochraně před bakteriálními infekcemi. Terpeny spadají mezi těkavé organické látky, díky kterým mohou rostliny interagovat s jinými organismy. Monoterpeny a seskviterpeny se řadí mezi dobře známé komunikační sloučeniny v interakcích rostlina-hmyz, zatímco vyšším terpenům je přiřazována funkce v boji proti biotickým a abiotickým stresům, např. karotenoidy (tetraterpeny), jako je β -karoten a lykopen, poskytují rostlinám barvu jako u rajčat (Rosenkranz et al. 2021).

Terpeny jsou pak i součástí latexu u *L. sativa*. Hlavní složky tvoří 15-oxalylové a 8-sulfátové sloučeniny guainilidových seskviterpenových laktonů, laktucinu, deoxylaktucinu a laktukopicinu. Seskviterpenové laktony jsou nestabilní a mohou při rozkladu vést k akumulaci kyseliny šťavelové v latexu uvolňovanému při poškození listů (Sessa et al. 2000).

Využití terpenů je široké. Některé se používají jako důležité farmaceutické přípravky, jelikož vykazují protizánětlivé, protinádorové, antidiabetické nebo antibakteriální účinky.

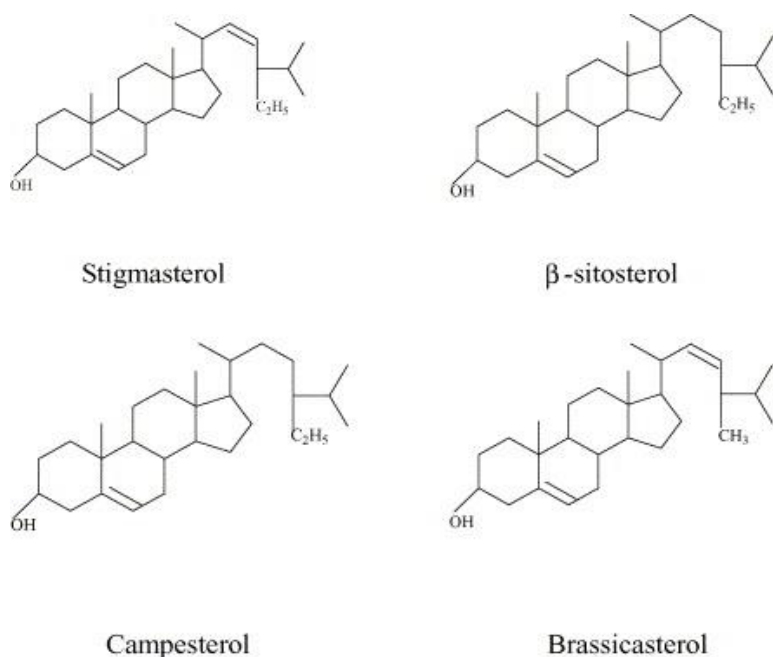
Monoterpeny jsou hlavní složkou vůní rostlin či éterických olejů, které se používají v parfumerii a průmyslu zabývajícím se aromatickými látkami. Na Obrázek 3 je uveden příklad dvou známých terpenoidních struktur (Cappiello et al. 2020).



Obrázek 3 - Chemická struktura monoterpenů.

3.2.3 Steroidy

Základem steroidů je cyklopentanperhydrofenantren syntetizovaný z tetracyklických terpenů. Hojně se vyskytují v luštěninách např. sezamu, cizrně, čočce nebo hrachu; dále pak v rostlinných olejích, ořechách a semenech. Nejhojnějšími fytoosteroly jsou β -sitosterol, campesterol a stigmasterol (Obrázek 4), které tvoří integrální přírodní složky membrán rostlinných buněk. Mají vlastnosti snižující hladinu cholesterolu, antiaterosklerotické, protizánětlivé a antioxidační působení, a tím mají i ochranný účinek proti kardiovaskulárním chorobám či protinádorový účinek (Ryan et al. 2007; Woyengo et al. 2009).

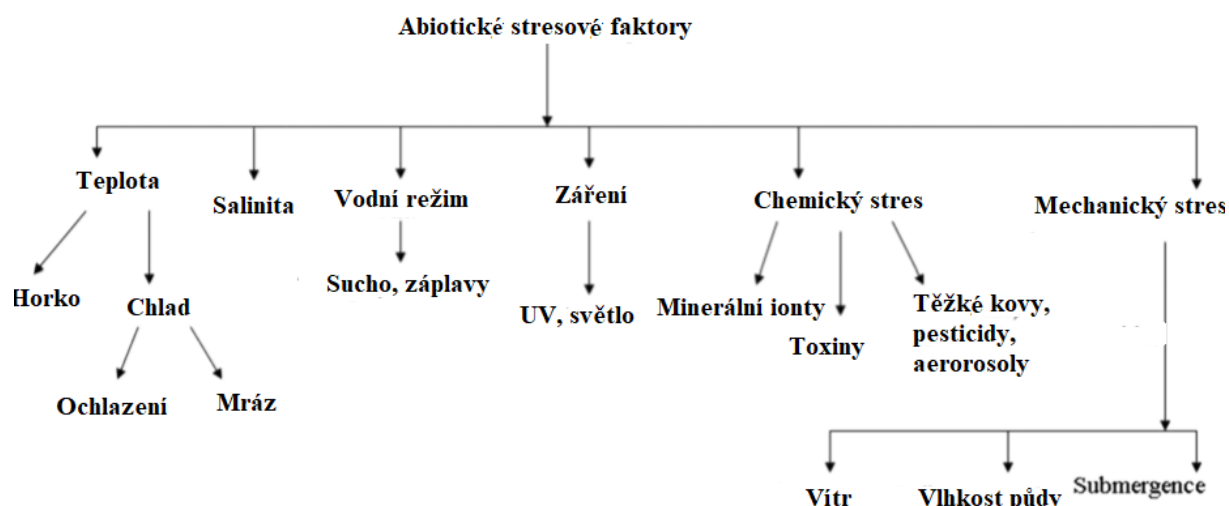


Obrázek 4 - Chemické struktury nejhojnějších fytoosteroidů.

3.3.1 Abiotický stres

V přírodě se stres nevyskytuje samostatně, ale mnoho stresových faktorů působí souběžně a navzájem se ovlivňují. Různé stresové signály, jak biotické, tak abiotické slouží jako iniciátory pro rostlinné buňky. Abiotický stres je hlavní příčinou devastací plodin po celém světě, protože snižuje průměrné výnosy většiny plodin až o 50 %, a tím je ohrožena udržitelnost zemědělské produkce.

Mezi abiotické stresové faktory (Obrázek 6) se řadí fyzikální faktory jako je teplota, salinita, nedostatek nebo přebytek vody, světlo a další záření, a potom stres způsobený látkami typu těžkých kovů nebo pesticidů. Abiotické stresové faktory ovlivňují tvorbu sekundárních metabolitů a celkový růst rostlin. Sekundární metabolity hrají hlavní roli při překonávání stresových podmínek, celkové adaptaci rostlin k prostředí, podílejí se na ochranných funkcích v reakci na podmínky abiotického stresu např. jednoduché a komplexní fenolické sloučeniny. Klíčovým enzymem je tady výše zmíněný PAL (EC 4.3.1.5), u kterého bylo dokázáno, že gen kódující tento protein reaguje na řadu abiotických stresů u mnoha druhů rostlin (Mahajan & Tuteja 2005; Tuteja & Sopory 2008; Oh et al. 2009; Ramakrishna & Ravishankar 2011).



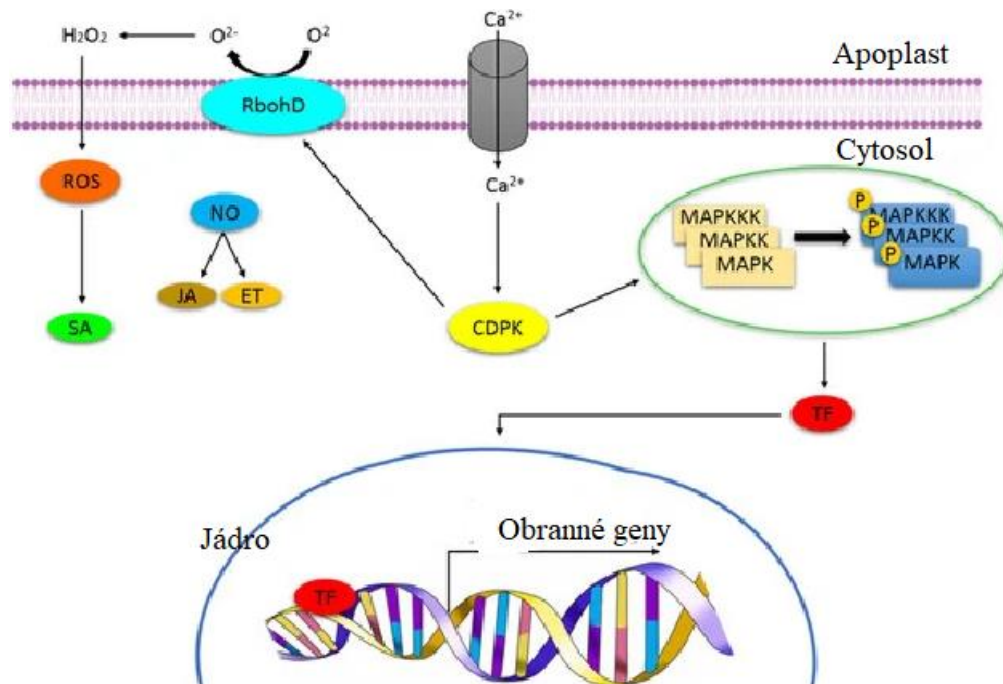
Obrázek 6 - Různé abiotické stresové signály vytvářející stres v rostlinách. Převzato od (Mahajan & Tuteja 2005).

Rostliny mají dvě hlavní strategie jako reakci na stres. První spočívá v přežití např. ve fyziologicky neaktivním stádiu, a tím i vyhnutí se stresu. Ta druhá je aktivní reverzibilní přizpůsobení. Mezi základní signální a regulační molekuly, které se podílí na zvládnání stresových situací u rostlin, patří vápník, kyselina abscisová (ABA), kyselina salicylová (SA), polyaminy a jasmonáty. Aby rostliny dokázaly čelit účinkům stresových faktorů, vyvinuly komplexní obranné mechanismy, které jim pomáhají tolerovat abiotické stresy pomocí adaptace. Prvním krokem v abiotických obranných mechanismech je zachycení signálů vyvolávající stres a jejich přenos k příslušným adaptivním reakcím na úrovni molekul. Buněčné reakce jsou iniciovány primárně interakcí extracelulárních molekul s proteinem v plazmatické membráně. Tato molekula se nazývá ligand (elicitor) a protein, který s ní reaguje je receptor (Ramakrishna & Ravishankar 2011; Lephatsi et al. 2021).

Stres je prvotně vnímán receptory na membráně rostlinných buněk, jako jsou histidinkinázy (HK) a receptorové kinázy (RLK). Existuje stále více důkazů, že právě RLK

jsou hlavními regulátory abiotického stresu. Přijatý signál je přenášen do různých signalizačních sítí, které vedou signál dále do buňky, a to vede k aktivaci druhotných posílů (Obrázek 7), mj. reaktivních forem kyslíku (ROS), eluci cytosolového vápníku, produkci inositolfosfátů nebo kaskádové zahájení odpovědi mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK). Tyto poslové pak často iniciují fosforylační kaskádu a zaměřují se na geny reagující na stres nebo na transkripční faktory řídící tyto geny. Díky produktům stresových genů, které pomáhají rostlině přežít nepříznivé podmínky, může dojít k adaptaci rostliny (Mahajan & Tuteja 2005; Xu et al. 2008; Steinhorst & Kudla 2013).

V reakci na abiotické stresy se tak zvyšuje biosyntéza sekundárních metabolitů včetně polyfenolů. Tyto sloučeniny mají antioxidační účinky, které jim pomáhají vychytávat nadbytečné ROS, a tím chrání buňku před škodlivými účinky oxidačního stresu (Sharma et al. 2019).



Obrázek 7 - Přehled obranné signalizace u rostlin pod abiotickým stresem. Při vnímaném stresu jsou aktivovány sekundární poslové jako jsou ROS, Ca^{2+} nebo NO, kteří pak indukují různé kinázy např. mitogen aktivovanou proteinkinázu (MAPK) nebo vápník-závislou proteinkinázu (CDPK). Tohle pak vede k aktivaci transkripčních faktorů (TF), enzymů a proteinů, kteří dále aktivují transkripci genů související s obranou proti stresům. Mimo jiné vznikají i fytohormony, které taky napomáhají k obraně rostlin např. kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) a ethylen (ET). Převzato a upraveno od (Lephatsi et al. 2021).

Jak bylo zmíněno výše, signalizace hraje zásadní roli při obraně proti abiotickému stresu. Signalizace pomocí Ca^{2+} hraje zásadní roli ve specifčnosti reakcí na stres, kdy po každém vjemu stoupá hladina intracelulárního obsahu vápníku jako odezva. Mechanismus je řízen různými pumpami a kanály. Tyto změny cytosolového vápníku se mohou vyskytovat v různých opakováních, kdy frekvence signálu je závislá na typu podnětu. Každý podnět má tedy vlastní originální informaci. Senzory vápníkových signálů mohou poté detekovat jakékoliv změny v hladinách a přenášet informace za účelem aktivace určitých kaskád např. na vápník-závislou proteinkinázu (CDPK) (Yang et al. 2010; Steinhorst & Kudla 2013).

Nejčastější reakcí rostliny při abiotickém stresu je produkce ROS, které slouží jako mechanismus včasné reakce. ROS se nachází v mírných hladinách u rostlin i během jejich růstu, abiotický stres však způsobuje jejich nadměrnou produkci, která může mít za následek i

smrt. Jejich tvorba je běžná během všech stresových situací a většinou i doprovázená jinou signální molekulou, i proto je možné použít různé senzory a tím vytvořit specifické signály pro různé typy a intenzity stresu (Mittler et al. 2011; Choudhury et al. 2017).

Pomocí fytohormonů mohou rostliny zesílit počáteční stresové signály v závislosti na typu stresu, se kterým se setkávají. Tyto typy signálu mohou buď vyvolat novou, ale podobnou signalizační síť jako je počáteční, nebo iniciovat zcela odlišnou s jinými složkami. Akumulace fytohormonů je často spojena s vyšším vyplavením ROS. Nejčastějším fytohormonem účastnícím se u abiotického stresu je ABA (Huang et al. 2012).

Zatímco signalizace pomocí ROS a vápníku se řadí mezi rychlé, kinázová kaskáda MAPK patří mezi pomalejší, ale neméně důležité signalizace v rostlině. Kaskáda MAPK je výsledkem řady fosforylačních reakcí, které aktivují příslušné geny v reakci na různé podněty. Kromě toho MAPK při stresu interagují s ostatními sekundárními posly (ROS, vápník) nebo/a fytohormony. Tyto interakce mají za následek řízené změny v biochemických, metabolických, transkripčních sítích, které vedou k přežití a aklimatizaci (Menges et al. 2008; Devireddy et al. 2021).

3.3.1.1 Sucho

Stres z vodního prostředí může být dvojitý – buď v důsledku přebytku vody nebo deficitu vody, který je častější možností. Přebytek vody nebývá častým problémem jako její deficit, dochází u něj i k menším následkům mj. k deficitu kyslíku, nahnívání kořenového systému a vadnutí rostliny.

Stres ze sucha je jedním z nejvýznamnějších abiotických faktorů ovlivňující růst a vývoj rostliny. Obvykle bývá doprovázený i vysokými teplotami a slunečním zářením, kdy se dostupná voda v půdě sníží na kritickou hodnotu a atmosférické podmínky přispívají k její trvalé ztrátě. Vystavení stresu suchem způsobuje u rostlin buněčnou dehydrataci ovlivňující negativně osmózu, přispívá ke ztrátě vody v membráně a dochází k narušení její dvojvrstvy. Membrána následně ztrácí svoji integritu, selektivitu a funkčnost v ní přítomných enzymů (Mahajan & Tuteja 2005; Xu et al. 2010; Ramakrishna & Ravishankar 2011).

Klíčový signální hormon při projevech stresu suchem je výše zmíněná ABA, která je většinou produkována v kořenech a transportována do výhonků, kde reguluje činnost průduchů. Větší množství ABA v listech je vysvětlováno, že akumulace ABA fyzikálními nebo chemickými signály kořenů by přímo regulovala pohyby stomat. Když je tedy rostlina vystavena mírnému suchu, průduch může být zúžen zaznamenáním fyzikálních nebo chemických signálů. Pokles stomatální vodivosti může omezit rychlost fotosyntézy a transpiraci vody. Výzkumy ukázaly, že vysokou hladinu ABA lze eliminovat, když je rostlina zavlažována do optimálního vodního stavu, což vedlo k otevření stomat. Naopak při rychlé dehydrataci nedochází k žádnému navýšení hormonu ABA. Celkový rozsah stimulace zavlažováním závisí rovněž na předešlé intenzitě a době trvání stresu, kdy silný stres může vyvolat i poškození tkání (Steudle 2000; Chaves et al. 2003; Wan et al. 2009; Xu et al. 2010).

Změny v obsahu primárních a sekundárních rostlinných sloučenin způsobených stresem ze sucha se liší v závislosti na rostlině a části rostliny používané ke konzumaci (Rajabbeigi et al. 2013). Sucho často způsobuje oxidační stres, během kterého se zvyšují hladiny flavonoidů a fenolových kyselin, ovlivňuje poměr chlorofylu „a“ a „b“ a karotenoidů (Anjum et al. 2003)

nebo dochází k snížení obsahu saponinů (Ramakrishna & Ravishankar 2011). Savoi et al. (2016) zjistili zvýšené množství fenylpropanoidů, monoterpenů a tokoferolů u hroznů vinné révy, zatímco akumulace karotenoidů byla nižší než u rostlin netrpící deficitem vody. Dále bylo zjištěno, že obsah fenolických sloučenin, jako je kyselina kávová, byl snížen v kořenech např. u povijnice batátové, zatímco rozpustné fenoly (např. kvercetin) byly zvýšeny u třezalky (De Abreu & Mazzafera 2005; Saqib et al. 2017). Konkrétně u hlávkového salátu De Abreu & Mazzafera (2005) prokázali celkové zvýšení obsahu fenolů, flavonoidu luteinu a došlo i k významnému nárůstu anthokyaninů v reakci na stres ze sucha.

3.3.1.2 Zasolení

Zvýšený obsah solí v půdě nebo ve vodě je jedním z hlavních stresů zejména v suchých a polosuchých oblastech a také může vážně omezit růst a produktivitu rostlin. Zasolené prostředí vede k buněčné dehydrataci, které způsobuje osmotický stres a odstranění vody z cytoplazmy. Solný stres často vytváří iontový stres, který vede k akumulaci nebo snížení specifických sekundárních metabolitů v rostlinách. Salinita v dané oblasti závisí na několika různých faktorech, jako je množství odpařování, intenzita světla, druh rostliny nebo množství srážek. Vysoké koncentrace soli může dokonce snižovat pórovitost půdy, a tím je pro rostlinu obtížnější získat vodu a živiny z půdy. Stres z vysokého obsahu soli má tedy vlastně následek stav nedostatku vody a může mít podobu fyziologického sucha. Kromě iontových a osmotických komplikací vede solný stres také k oxidativnímu stresu prostřednictvím zvýšení množství ROS, jako je superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály. Ke zmírnění a nápravě poškození způsobeného ROS, si rostliny vyvinuly specifické obranné mechanismy, mj. fotorespiraci nebo xantofylový cyklus. Hladiny ROS jsou regulovány rychlostí jejich tvorby, rychlostí reakce s cílovou látkou (např. nukleové kyseliny, lipidy, proteiny) a rychlostí vychytávání enzymatickými a neenzymatickými antioxidanty. Hlavní ionty, které se podílejí na signalizaci solného stresu, zahrnují Na^+ , K^+ , H^+ a Ca^{2+} (Sudhakar et al. 2001; Mahajan & Tuteja 2005; Yazici et al. 2007; Ramakrishna & Ravishankar 2011; Acosta-Motos et al. 2017).

Při vyvolání stresu zasolením byl pozorován nárůst obsahu polyfenolů v různých pletivech. Sarikamiş & Çakir (2017) zjišťovali hladinu glukosinolátu glukorafaninu (prekurzoru sulforanu, který je spojován s protirakovinnými účinky) v brokolici, jehož obsah byl u stresované rostliny nižší. U stresu vyvolaného solí se zvyšuje hladina anthokyaninů jako reakce na stres např. u *Bruguiera parviflora*, L. nebo *Grevillea ilicifolia* (Parida & Das 2005), na druhou stranu u druhů citlivých na sůl jako jsou brambory se hladina anthokyaninů snížila (Daneshmand et al. 2010).

3.3.1.3 Teplota

Teplota silně ovlivňuje metabolickou aktivitu rostlin. Kolísání teploty má účinek na propustnost bariér, rychlost intracelulárních reakcí rostlinných buněk a může následně ovlivnit růst a produkci sekundárních metabolitů. Vysoké teploty mohou vyvolat předčasné stárnutí listů nebo způsobit změny ve složení cytoskeletu, ovlivňují růst rostlin, metabolismus a produktivitu. Při extrémně vysoké teplotě může dojít až k poškození buněk nebo buněčné

smrti. Vysoká teplota tedy způsobuje vážnější a rychlejší poškození než stres chladem, ale na druhou stranu je méně časté (Morison & Lawlor 1999).

Nízká teplota je jedním z nejškodlivějších abiotických stresů ovlivňující zejména rostliny mírného pásu, které upravují svůj metabolismus a zvyšují tak obsah řady ochranných sloučenin, aby se dokázaly přizpůsobit změnám teploty. Během zimování využívají cukerné alkoholy (sorbitol), rozpustné cukry (sacharózu) nebo nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny (prolin). Hlavním rizikovým účinkem zmrazení je poškození membrány, spojené s akutní dehydratací. Ta je spojená s lipidovou strukturou v membráně a tzv. přechodovou teplotou. Podíl nenasyčených mastných kyselin v membráně ovlivňuje „tekutost“ membrány, která se může po překročení přechodové teploty změnit z polotekutého stavu na semikrystalickou. Rostliny citlivé na chlad mají obvykle vyšší podíl nasycených mastných kyselin, a tím i vyšší teplotu přechodu. Druhy odolné proti mrazu se naproti tomu vyznačují vyšším podílem nenasyčených mastných kyselin a odpovídajícím způsobem nižší teplotou přechodu (Mahajan & Tuteja 2005; Janská et al. 2010; Ramakrishna & Ravishankar 2011).

Hlavním faktorem pro zvýšení tolerance vůči chladu je fenomén zvaný „studená aklimatizace“, která má za následek ochranu a stabilizaci integrity buněčných membrán, posílení antioxidantních mechanismů, zvýšenou mezibuněčnou hladinu cukrů a akumulaci kryoprotektantů, mj. polyaminů, které chrání intracelulární proteiny indukující geny kódujících molekulární řetězce. Rovněž i vápník je důležitým poslem v dráze přenosu signálu při nízkých teplotách. Změna hladin cytosolického vápníku je nezbytným prvním krokem v mechanismu snímání teploty, který umožňuje rostlině lépe odolávat budoucímu chladovému stresu (Mahajan & Tuteja 2005)

Stres z chladu zvyšuje produkci fenolů a jejich následné zabudování do buněčné stěny v rámci látek jako suberin nebo lignin. Ukázalo se, že lignifikace nebo zabudování suberinu chrání rostliny vůči nízkým teplotám nebo před poškozením mrazem (Griffith & Yaish 2004). U jiných rostlin (např. u jabloní) se jako účinná kryoprotektivní látka ukázala kyselina chlorogenová. Lei et al. (2004) uvedl, že melatonin chrání chladovou apoptózou a zlepšuje klíčení během mrazu (Posmyk et al. 2009). Nižší teplota taky podporuje akumulaci anthokyaninů u jahodníku, ale zpomaluje tím růst buněk (Morison & Lawlor 1999). Nižší teploty půdy pak způsobily v rostlinách zvýšení hladin steroidů a saponinů, např. u perilly křovité (Szakiel et al. 2011).

Jedním z hlavních důsledků stresu vysoké teploty je opět nadměrná tvorba ROS. Rostlina je schopna do určité míry tolerovat tepelný stres fyzickými změnami ve svých orgánech a často vytvářením signálů pro změnu metabolismu, zejména produkcí rozpuštěných látek, které jsou schopny organizovat proteiny a buněčné struktury, udržovat buněčný turgor a modifikovat antioxidantní systém tak, aby obnovil homeostázu. Hlavními hormony produkovánými při stresu z vysoké teploty jsou auxiny, SA a ABA. SA zabraňuje oxidativnímu poškození ROS v membránách v rostlinách, je tedy z jedním faktorů k zvýšení tepelné odolnosti, stejně tak jako klíčový hormon ABA, který ovlivňuje uzavírání průduchu při osmotickém stresu. Stres z vysoké teploty zvyšuje u čeledi *Brassicaceae* akumulaci fenylypropanoidů, zatímco koncentrace karotenoidů byly po tepelném ošetření sníženy (Ramakrishna & Ravishankar 2011; Hasanuzzaman et al. 2013; Qu et al. 2013).

3.3.1.4 Světlo a záření

Světlo je fyzikální faktor, který může ovlivňovat produkci metabolitů. Fenolické sloučeniny, jako jsou flavanoidy nebo hydroxyskořicová kyselina, působí jako primární složky absorbující světlo, zejména UV-B. Ochranné účinky flavonoidů jsou připisovány jejich schopností pohlcovat volné radikály, přenášet je jako volné elektrony nebo aktivovat antioxidantní enzymy a inhibovat oxidázy (Heimler et al. 2007; Rajabbeigi et al. 2013).

Celkově záření ovlivňuje hladinu anthokyaninů, který byl pozorován např. u jablek, kdy dochází ke stimulaci jejich tvorby při UV záření o vlnové délce 280-300 nm (Arakawa et al. 1985), rovněž Zhong et al. (1991) popsali pozitivní vliv světelného záření na produkci anthokyaninů v *in vitro* suspenzních kulturách *Perilla frutescens* L. Larson (1988) uvádí pokles listových tříslovin a fenolických složek u zastíněných vrb. Dále bylo pozorováno, že i UV-B zvyšuje obsah sekundárních metabolitů typu dalších flavonoidů (Fischbach et al. 1999), polyaminů (Kramer et al. 1991), a celkově aktivitu PAL, spojené s poklesem obsahu chlorofylu (Liang et al. 2006). De Abreu & Mazzafera (2005) popsali zvýšenou akumulaci celkových fenolů u třezalky nevonné při stresu z UV záření, naproti tomu Rajabbeigi et al. (2013) žádnou zvýšenou akumulaci u *L. sativa* nepotvrdili. Avšak u obou výzkumu došlo k nárůstu produkce kvercertinu, a pouze lehkému nárůstu anthokyaninů.

3.3.1.5 Chemický stres

Chemický stres lze rozdělit do dvou skupin – nutriční, kdy rostliny trpí nedostatkem nebo nadbytkem minerálů pro jejich správnou funkčnost a toxický, který se týká látek znečišťujících půdu a vodu jako jsou těžké kovy, pesticidy nebo i léčiva, jak je popsáno dále. V současné době převládá kontaminace životního prostředí těmito chemikáliemi, což je velmi znepokojivé, jelikož rostliny mají schopnost tyto látky absorbovat (Martins et al. 2011; Galieni et al. 2015; Chen et al. 2020; Kolahi et al. 2020).

Jak bylo uvedeno výše, rostlinné buňky jsou schopné zmírnit škodlivé účinky a poškození, které mohou být způsobeny volnými radikály, prostřednictvím různých antioxidantních obranných systémů. Enzymatické antioxidanty, jako je superoxiddismutáza (SOD), kataláza, (CAT), askorbátperoxidáza (APX), guajakolperoxidáza (GPX) a glutathionreduktáza (GR) a neenzymatické antioxidanty, které zahrnují askorbát (AsA), glutathion (GSH), karotenoidy alkaloidy, tokoferoly, prolin a fenolické sloučeniny slouží jako lapače volných radikálů. Tyto enzymy a rostlinné metabolity se podílejí i na detoxikaci kovů na buněčné úrovni (Jibril et al. 2017; Ighodaro & Akinloye 2018).

Ačkoliv některé těžké kovy (např. zinek, nikl, železo a další) jsou v nízkých koncentracích pro některé metabolické pochody nezbytné, jejich zvýšené koncentrace mají negativní dopad na fotosyntézu, tvorbu biomasy a růst rostlin. Koncentrace sekundárních metabolitů jsou často závislé na podmínkách pěstování a mají vliv na metabolické cesty (Ramakrishna & Ravishankar 2011; Chalker-Scott & Fuchigami 2018). Například nikl ve stopových množstvích je základní složkou enzymu ureázy, potřebný pro vývoj rostlin. Avšak zvýšené koncentrace tohoto kovu růst zpomalují (Ramakrishna & Ravishankar 2011). Naopak nízká koncentrace železa způsobuje zvýšené vylučování fenolových kyselin z kořenů. Produkci sekundárních metabolitů také ovlivňují ionty kovů, jako jsou lanthan, europium,

stříbro nebo kadmium. Některé stopové prvky pak omezují biosyntézu anthokyaninů inhibicí PAL (Krupa et al. 1996), kdy významná redukce těchto pigmentů byla prokázána v důsledku stresu Ni (Hawrylak et al. 2007). Dále bylo prokázáno, že Cu^{2+} a Cd^{2+} vyvolávají vyšší výtěžky sekundárních metabolitů, jako je shikonin nebo digitalin (Ramakrishna & Ravishankar 2011).

Chen et al. (2020) poukázali, že rozdíly v metabolismu fenolů mohou vznikat na základě rozdílné tolerance hliníku mezi genotypy salátu. Při stresu tolerantní genotypy rychle zvýšily aktivitu enzymů souvisejících se syntézou fenolů, čímž se zvýšila biosyntéza unikátních polyfenolických sloučenin, a tím se zvýšila akumulace fenolů v rostlinných buňkách. V důsledku toho byly rostliny schopny zmírnit oxidační stres vyvolaný hliníkem.

3.4 Xenobiotika

Lidská činnost poskytla světu širokou škálu chemických látek, které se buď záměrně nebo náhodou mohou dostat do životního prostředí jako jeho kontaminanty. Jedná se většinou o cizorodé sloučeniny, obecně nazývané jako xenobiotika. Kromě běžných organických polutantů a pesticidů se sem řadí mimo jiné i léčiva a jejich rezidua. Zvyšující se povědomí o znečištění životního prostředí znamená i zvyšující se počet hlášených míst (Schröder & Collins 2002; Leitão et al. 2021a).

Tyto polutanty, pocházející hlavně z odpadních vod domácností nebo farem, se vyskytují v pitné vodě, půdě či sedimentu, kam se dostávají po průchodu organismem. Velkou mírou tomu přispívá i např. nadměrné používání léčiv v chovu zvířat, které má za následek znečištění orné půdy. Konvenční procesy čištění odpadních vod často nedokáží mnoho z těchto sloučenin odstranit a v odpadních vodách čistíren odpadních vod jsou detekovány významné hladiny léčivých látek, které se pohybují v koncentracích mezi nanogramy na litr až mikrogramy na litr. Xenobiotika se mohou v rostlinách hromadit různými způsoby a potenciálně kontaminovat potravní řetězec. Kromě toho není oblast o interakcích mezi xenobiotikem a rostlinou, jako je absorpce, transport a metabolické cesty, tolik prozkoumaná i když je prokázáno, že rostliny jsou schopna xenobiotika z kontaminované půdy či vody absorbovat (Ternes et al. 2007; Bartha et al. 2010; Leitão et al. 2021a).

Podle Schröder & Collins (2002) vykazují rostliny podobné způsoby detoxikace jako játra savců, kteří jimi metabolizují větší část xenobiotik. Enzymatická degradace xenobiotik v rostlinách obvykle zahrnuje několik kroků, než se vytvoří „bezpečný“ produkt určité stability. Během rostlinného metabolismu xenobiotik dojde k aktivaci znečišťující látky prostřednictvím specifických enzymatických reakcí (fáze I), následovaných detoxikací pomocí konjugace (fáze II) a sekvestrací sloučenin z citlivých organel (fáze III).

Příjem xenobiotik kořenem a jeho pohyb rostlinou je závislý hlavně na fyzikálně-chemických vlastnostech dané látky, a je popsán kořenovým koncentračním faktorem (RCF). Tento faktor je dán vzorcem $-\text{Log}(\text{RCF} - 0,82) = 0,77 * \log(\text{Kow} - 1,52)$.

Jak již bylo zmíněno výše, prvním krokem degradace xenobiotik je aktivace, většinou katalyzována P-450 monooxygenázami nebo peroxidázami (POX). Tyto enzymy jsou lokalizovány v membránách buněk, v apoplastu nebo cytosolu. Činností enzymů dochází k vytvoření hydroxylové skupiny, na kterou se pak mohou vázat polárnější látky.

Po fázi aktivační následují konjugační reakce. Zde jsou navázány na aktivovaná xenobiotika molekuly cukrů, aminokyselin nebo glutathionu v závislosti na struktuře a jejich aktivních místech. Tento přenos je zprostředkován enzymy glykosyltransferázami (EC 2.4.1.x) a glutathion-S-transferázami (EC 2.5.1.18). Přestože jsou těmito reakcemi detoxikovány, ukazuje se, že tyto konjugáty jsou obvykle dále zpracovávány na složitější sloučeniny nebo štěpeny za vzniku reaktivních molekul, které jsou vylučovány z živé buňky a ukládány v buněčné stěně nebo apoplastu (Schröder & Collins 2002; Bowles et al. 2005; Huber et al. 2009).

Glykosylace je klíčovým mechanismem metabolické homeostázy buněk, jelikož se svými četnými funkcemi a rozmanitostí možných substrátů (mj. buněčné hormony, xenobiotika nebo sekundární metabolity) hrají glykosyltransferázy hlavní roli při tlumení dopadů biotických nebo abiotických stresových faktorů na rostlinu. U vyšších rostlin mohou glykosidy xenobiotik a glykosidy flavonoidů podléhat další transformaci, a tou je malonylace. Jedná se o další specifický adaptační systém k úpravě molekul a vytváří se při ní modifikační struktury flavonoidů. Tato reakce je katalyzována malonyltransferázami, která používá malonyl-CoA jako donor katalyzující transacylaci v řadě fenolických a naftolových glykosidů (Schröder & Collins 2002; Manjasetty et al. 2012; Bártíková et al. 2015).

Mnoho xenobiotik, metabolitů a konjugátů není schopno díky své velikosti projít lipidovou membránou. Z toho důvodu musí být translokovány pomocí specifických transportních proteinů zahrnující hlavně dvě skupiny přenašečů, jmenovitě transportéry ATP-binding cassette (ABC) a multidrug and toxins extrusion (MATE). Kromě xenobiotik jsou tyto transportéry také zapojeny do přenosu široké škály endogenních sloučenin, včetně auxinů, flavonoidů, konjugátů GSH a chelátorů kovů (Conte & Lloyd 2011; Nuruzzaman et al. 2014).

3.4.1 Léčiva

Léčiva se řadí do skupiny neregulovatelných kontaminantů, které zahrnují produkty osobní či veterinární péče, ale i pesticidy, herbicidy a další průmyslové sloučeniny o nichž se předpokládá, že mají dlouhodobý účinek na ekosystém. Z důvodu významného nárůstu těchto kontaminantů v prostředí je nezbytné pochopit, jak tyto sloučeniny mohou ovlivnit metabolismus různých organismů, zejména pak rostlin i s ohledem na počet hlášení o častých výskytech těchto látek jak v evropských zemích, tak i mimo ně. Při expozici kontaminantů rostliny aktivují své obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu, což vede k produkci signálních molekul a různých druhů proteinů bojující proti tomuto stresu, včetně těch souvisejících se sekundárním metabolismem (Huber et al. 2009; Garcia-Rodríguez et al. 2014; Leitão et al. 2021a).

Projevy oxidačního stresu, a tím i zvýšení produkce signálních molekul, bylo prokázáno v mnoha studiích, kdy Dordio et al. (2011) popisovali zvýšenou aktivitu SOD a CAT u *Typha* spp. kontaminovaných karbamazepinem (CBZ). Alkimin et al. (2019) sledovali účinky tří léčiv - paracetamolu, diklofenaku a chlorpomazinu na *Lemna minor* L. a *Lemna gibba* L., kde prokázali rovněž zvýšenou aktivitu CAT u všech tří léčiv.

Klíčovou roli u detoxikace léčiv (a celkově i u xenobiotik) hrají u rostlin glykosyltransferázy (UGT). Větší množství glykosidů byla detekována u *Phragmites australis*

CAV. kontaminované benzimidazolovým anthelmintikem (Podlipná et al. 2013) nebo při vystavením většího množství organochloridů, což dokazuje účinnou adaptaci rostliny na chemický stres a zlepšenou ochranu rostlin (San Miguel et al. 2013).

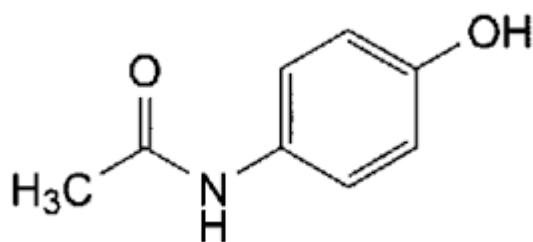
Leitão et al. (2021) prokázal zvýšenou aktivitu cinnamylalkoholdehydrogenázy v kořenech salátu kontaminovaného CBZ. Tento enzym se podílí na metabolismu fenylpropanoidů, které jsou jako jedny z hlavních sekundárních metabolitů spojeny s různými druhy stresů. Navíc enzym PAL také vykazoval vyšší hodnoty u kořenů při kontaminaci tímto léčivem nad kontrolou, což odpovídalo, že aktivita PAL se zvyšuje v závislosti na faktorech prostředí, jako je oxidační stres (Sharma et al. 2019).

Rostliny ovlivňují i toxické látky typu pesticidů nebo insekticidů, při nichž se také aktivují biosyntetické dráhy fenolů se zvýšenou akumulací fenolických látek a větší odolností proti těmto xenobiotikům. V listech je naopak zvýšená akumulace anthokyaninů, které pak pomáhají k obnově fotosyntetické účinnosti rostlin (Sharma et al. 2016; Wang et al. 2019).

3.4.2 Paracetamol

Paracetamol (acetaminofen) je široce rozšířené analgetikum, antiflogistikum a antipyretikum v humánní medicíně a každý rok se ho spotřebuje řádově miliardy dávek. Jedná se tak o jednu z možných problémových sloučenin ve vodních společenstvích. Toto léčivo se pravděpodobně může nacházet v jakémkoli vodním útvaru ovlivněném surovou nebo vyčištěnou odpadní vodou, včetně řek, potoků, jezer a nádrží a podzemních vod. Mnohé se používají jako zdroje pitné vody, a to může mít vliv nejen na lidské zdraví, ale i ohrozit dynamiku ekosystému. (Glick 2003; Huber et al. 2009; Yang et al. 2011).

Chemicky se jedná o benzenový kruh s navázanou hydroxylovou skupinou a amidovou skupinou v poloze 1 a 4 (Obrázek 8). U savců je paracetamol detoxikován v játrech, kde při nízkých dávkách podléhá sulfataci a glukuronidaci a vede k tvorbě příslušných neaktivních, netoxických konjugátů. Intoxikace nastává při požití vysokých koncentrací léčiva, kdy může být vytvořen N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), reaktivní metabolit, který interaguje s proteiny a nukleovými kyselinami (Huber et al. 2009).



Obrázek 8 - chemická struktura paracetamolu.

Huber et al. (2009) zkoumali detoxikaci paracetamolu v *Armoracia rusticana* L. Dokázali, že oba nejvýznamnější detoxikační mechanismy (konjugace s GSH a tvorba glukosidů) se současně podílejí na metabolismu paracetamolu. Metabolit paracetamol-glukosid byl dominantní metabolitem, zatímco konjugace s GSH se probíhala výhradně s

toxickým NAPQI a vyžadovala aktivaci paracetamolu komplexem enzymu monooxygenázy P450. NAPQI představoval ale pouze malou část metabolitů.

Bartha et al. (2010) ukázali, že rostliny *Brassica juncea* L. jsou schopné přijmout, metabolizovat a hromadit paracetamol nejen v kořenech, ale i v jedlých výhoncích. Zatímco v kořenových pletivech byl dominantní GSH konjugát, v pletivech listů byla vyšší koncentrace glykosyl-konjugátu a nevykazovala žádný významný pokles ani po týdnů. Na základě těchto měření se zdá, že glykosyl-konjugát je stabilní metabolit a hlavní detoxikační proces se zdá být lokalizován v listech rostlin.

Nadměrné množství paracetamolu má vliv i na primární metabolismu rostlin. Kudrna et al. (2020) prokázali významné snížení fotosyntézy, stejně tak chlorofylu. Zároveň se zvýšenou koncentrací paracetamolu, došlo ke zvýšení obsahu karotenoidů. Lze tedy říct, že zvýšené množství karotenoidu v listech salátu je reakcí rostlin na xenobiotika a poskytují tak ochranu před oxidačním poškozením (Pierattini et al. 2018).

Závěrem lze říct, že existuje mnoho studií, které dokázaly, že xenobiotika ovlivňují sekundární metabolismus rostlin i jejich přibližný mechanismus, nicméně je tohle téma otevřené k dalšímu a podrobnějšímu studiu.

4 Metodika

Nomenklatura odborných názvů rostlin byla zpracována podle Klíče ke květeně ČR (Slavík & Štěpánová 2011).

4.1 Použité materiály a přístroje

4.1.1 Výchozí látky a použitá činidla

Butylovaný hydroxy toluen (BHT)
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Dusitan sodný (NaNO_2)
Etanol
Folin-Ciocalteu roztok
Fosfátový pufr pH 50mM, 7.4,
Fosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
Heptamolybdenan amonný tetrahydrát ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)
Hydrogenfosforečnanu sodný dihydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Hydroxid sodný (NaOH)
Chlorid draselný (KCl)
Chlorid draselný pufr 25mM, pH 1
Chlorid hlinitý hexahydrát ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
Kyselina askorbová
Kyselina chlorovodíková (HCl)
Kyselina sírová (H_2SO_4)
Ledová kyselina octová
Molybdenan amonný
Molybdenan sodný
Octan sodný
Octan sodný pufr 0,4M, pH 4.5
Peroxid vodíku (H_2O_2)
Uhlícitan sodný (Na_2CO_3)
Voda destilovaná
Voda ultračistá

4.1.2 Přístrojové vybavení

Laboratorní sklo (kádinky, varné baňky, zkumavky)
Liebigův zpětný chladič
pH metr
Pipety
Spektrofotometr
Sušárna
Vodní lázeň

4.1.3 Rostlinný materiál

Pro sledování vlivu paracetamolu na obsahové látky byla použita odrůda lociky seté 'Král Máje'. Materiál byl získán z rostlin pěstovaných ve skleníků v rámci nádobových pokusů při použití jednorázové (A) nebo opakované (CH) zálivky testované látky. Rostliny byly vystaveny pěti různým koncentracím paracetamolu – 0 (kontrola, V1), 5 μM (V2), 50 μM (V3), 500 μM (V4) a 5 mM (V5). Vzorky byly odebírány před zahájením pokusu a pak po 24, 48, 72, 168, 240 a 336 h. Polovina rostlin byla po 48 h, již po proběhlém odběru, vystavena opětovné dávce paracetamolu o své stejné koncentraci, a tato zálivka byla opakována každých 48 h.

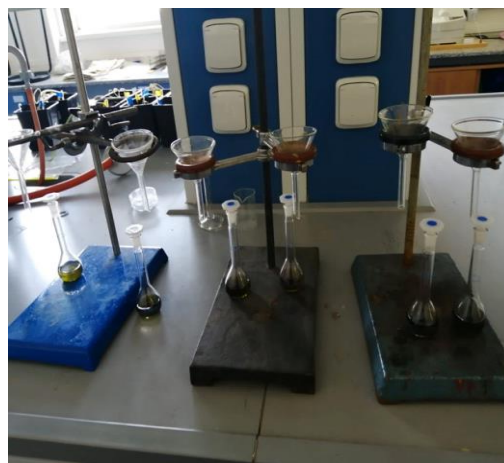
Pro další sledování vlivu paracetamolu byl získán i rostlinný materiál z rostlin pěstovaných za stejných podmínek, ale paracetamol byl aplikován foliárně pouze jednou, a to v koncentraci 5 mM (V2) a sledované parametry pozorovány proti kontrole (V1).

Sesbíraný materiál byl vysušen v sušárně při 40° C, a poté uchován v temnu a suchu. Rostlinná hmota byla následně rozemleta v mlýnku PULVERISETTE 14 (Fritsch) a přeseta přes síto (355), aby byla zajištěna homogenita testovaného materiálu.

4.2 Použité metody

4.2.1 Příprava extraktů

Do varné baňky bylo naváženo přibližně 0,3000 g homogenizovaného rostlinného materiálu, který byl extrahován 85% etanolem. Extrakce probíhala ve vodní lázni zahřáté na 80 °C pod Liebigovým chadičem (Obrázek 9) a k zabránění skrytému varu byly přidány varné kamínky. Směs s 15 ml etanolu byla zahřívána 30 minut a po zfiltrování do odměrné baňky na 25 ml (Obrázek 9) byla extrakce vzorku zopakována ještě jednou za stejných podmínek. Objemy rozpouštědel byly následně spojeny a případně doplněny v odměrné baňce po rysku.



Obrázek 9 - Extrakce pod Liebigovým zpětným chlazením (vlevo) a filtrace vzorků do odměrných (25 ml) baněk (vpravo). Foto autora (2021).

4.2.2 Stanovení celkových flavonoidů

Ke stanovení celkových flavonoidů (TFC) byla použita spektrofotometrická metoda využívající vzniku komplexu mezi flavonoidy a hliníkem podle (Ying & Wan 2012). Do

zkumavky bylo napipetováno 400 µl extraktu, ke kterému bylo přidáno 160 µl destilované vody. Po přidání 120 µl 5% NaNO₂ se nechal vzorek inkubovat při laboratorní teplotě a po 5 minutách bylo ke směsi přidáno 120 µl 10% AlCl₃ a vzorek se opět nechal inkubovat dalších 6 minut. Na závěr bylo přidáno 800 µl 1M NaOH a vzorek doplněn na 2 ml destilovanou vodou. Absorbance vzorku byla měřena při 415 nm a celkový obsah flavonoidů byl vypočten z kalibrační křivky a výsledek byl vyjádřen v ekvivalentu kvercetinů (QE) v mg/g suché hmotnosti.

4.2.3 Stanovení celkových fenolů

Ke stanovení celkového fenolického obsahu byla použita Folin-Ciocalteu metoda (Marinova et al. 2005), kdy probíhá oxidace fenolických látek v alkalickém prostředí za vzniku měřeného modrého komplexu. Do zkumavky bylo napipetováno 500 µl extraktu, ke kterému bylo přidáno 1,5 ml 10× zředěného roztoku Folin-Ciocalteu. Výsledná směs se nechala 6 minut inkubovat při laboratorní teplotě a následně bylo napipetováno 1,6 ml 7% Na₂CO₃. Výsledný roztok byl doplněn destilovanou vodou na celkový objem 5 ml. Výsledný roztok byl 90 minut inkubován ve tmě při laboratorní teplotě a následně byla změřena jeho absorbance při 760 nm. Celkový obsah fenolů byl vypočten z kalibrační křivky a výsledky byly vyjádřeny v ekvivalentu kyseliny gallové (GAE) mg/g suché hmotnosti.

4.2.4 Stanovení celkových fenolických kyselin

Ke stanovení celkových fenolických kyselin byla použita upravená metoda dle Českého lékopisu 2017. Do zkumavky bylo napipetováno 200 µl extraktu, ke kterému bylo následně přidáno 200 µl 0,5M HCl, 200 µl NaNO₂, 200 µl Na₂MoO₄, 400 µl 1M NaOH a 800 µl destilované vody. U výsledné směsi byla po promíchání změřena její absorbance při 490 nm a celkový obsah fenolických kyselin byl zjištěn z kalibrační křivky a výsledky byly vyjádřeny v ekvivalentu kyseliny kávové (CAE) v mg/g suché hmotnosti.

4.2.5 Stanovení celkového obsahu anthokyaninů

Ke stanovení celkového obsahu anthokyaninů byla použita diferenční metoda podle (Park et al. 2018). Se změnami pH anthokyaninové pigmenty procházejí reverzibilní strukturální transformací, která se projevuje odlišnými spektry absorbance. Měření bylo prováděno při pH 1 a pH 4,5. Do jedné zkumavky bylo napipetováno 200 µl extraktu a 1,8 ml pufru chloridu draselného (pH 1) do druhého rovněž 200 µl extraktu a 1,8 ml pufru octanu sodného (pH 4,5). Směsi byly inkubovány 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Výsledný roztok byl bezbarvý a měření absorbance bylo provedeno při 510 a 700 nm. Výsledná absorbance byla vypočítána podle vzorce:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4,5}$$

, kdy A je absorbance celková, A₅₁₀ pH 1 je absorbance u pH 1 při 510 nm, A₇₀₀ pH 1 je absorbance u pH 1 při 700 nm, A₅₁₀ pH 4,5 je absorbance u pH 4,5 při 510 nm a A₇₀₀ pH 4,5 je absorbance u pH 4,5 při 700 nm.

Koncentrace (mg/l) anthokyaninů byla vypočítána podle vzorce:

$$\frac{mg}{l} = A \times MW \times DF \times 1000 / (\epsilon \times l)$$

A – celková absorbance

MW – molární hmotnost; 449,2

DF – faktor ředění

ϵ – absorpční molární koeficient cyanin-3-glukosidu (26,900) o $M_w=449,2$

Výsledná hodnota byla přepočítána na mg/g.

4.2.6 Stanovení antioxidační kapacity

Ke stanovení byla použita spektrofotometrická metoda (Prieto et al. 1999) založená na redukci molybdenu z oxidačního čísla VI na V analytem vzorku a následné tvorbě zeleného fosforečnan/molybden v kyselém prostředí. Do zkumavky bylo napipetováno 50 μ l extraktu spolu s 50 μ l ultračisté vody a 1 ml činidla pro stanovení antioxidační kapacity připraveného z fosforečnanu sodného a heptamolybdenanu amonného v přítomnosti kyseliny sírové. Výsledná směs se vzorkem byla 1,5 hodiny zahřívána v lázni při 95 °C. Po vychladnutí bylo provedeno měření absorbance při 695 nm a kapacita vypočítána jako ekvivalent kyseliny askorbové (AE) v mg/g sušiny.

4.2.7 Vychytávání peroxidu vodíku

Vychytávání peroxidu vodíku (hydrogen peroxide free-radical scavenging ability; HP-FRSA) byla stanovena podle Park et al. (2018). Bylo připraveno 20 μ l 33% peroxidu vodíku ve 100 ml fosfátového pufru o pH 7,4. Do Eppendorfových zkumavek bylo přidáno 0,1 ml extraktu, 0,6 ml připraveného peroxidu a 0,3 ml fosfátového pufru. Směs byla měřena proti slepému vzorku, kterým byl fosfátový pufr o pH 7,4 a kontrola roztoku 0,4 ml pufru a 0,6 ml čistého peroxidu. Jako standart byla použita kyselina askorbová. Směsi byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po inkubaci byla změřena absorbance při 240 nm pomocí spektrofotometru. Aktivity pohlcující peroxid vodíku byly vypočteny následovně:

$$\text{Aktivita pohlcování radikálů peroxidu vodíku (\%)} = (A_0 - A_1) / (A_0 \times 100)$$

, kdy A_0 je absorbance kontroly a A_1 je absorbance vzorku. Stejným způsobem proběhlo stanovení i u zbývajících vzorků.

4.2.8 Statistická analýza

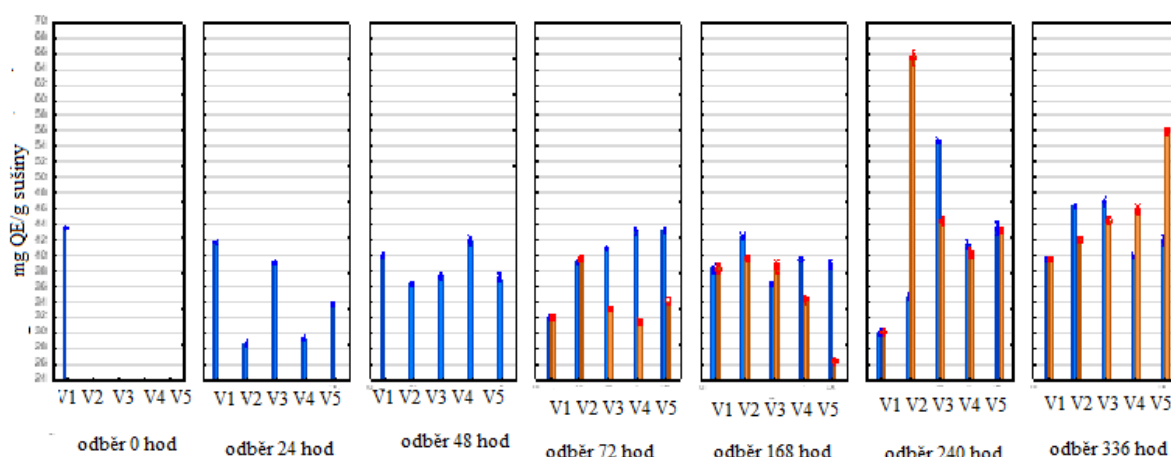
K testování rozdílů byla použita one-way ANOVA. Průkazné rozdíly na hladině významnosti $\alpha=0,05$ mezi průměry byly testovány pomocí Tukey HSD post-hoc metody. Tyto testy se prováděly po zamítnutí nulové hypotézy, kdy p je menší než 0,05 a pomáhají nám nalézt homogenní skupiny v testovaných datech (Lepš & Šmilauer 2016). Veškeré výpočty byly provedeny v programu Statistica 13.5 (Statsoft, Tulsa, USA)

5 Výsledky

5.1 Aplikace paracetamolu zálivkou

5.1.1 Stanovení celkových flavonoidů

Na Graf 1 je uveden celkový obsah flavonoidů (TFC) v listech salátu v závislosti na působení paracetamolu aplikovaného jednorázovou nebo kontinuální zálivkou. Nejvyšší hodnota TFC byla naměřena po 240 h v rostlinách, kde byl použit opakovaně roztok o koncentraci 50 μM . Nejnižší hodnota byla ale naměřena také u chronicky zatížené varianty, a to po 168 h v případě zálivky o 5mM koncentraci paracetamolu. Vzhledem k tomu, že na základě provedené statistiky je hodnota p menší než 0,05, existuje statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu flavonoidů mezi měřenými vzorky.



Graf 1 - Stanovení celkového obsahu flavonoidů po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μM , V3 = 50 μM , V4 = 500 μM , V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření \pm SD, (F,12 102)=216,02, $p=0,0000$.

Během prvních třech dnů od zahájení pokusu, TFC v sušině kontroly (V1) kolísá, kdy po 72 h byl obsah menší v porovnání s prvními dvěma odběry. Po 168 h a 336 h došlo k opětovnému nárůstu obsahu flavonoidů, ale mezi nimi byl v rámci odběrů zaznamenán výrazný pokles v případě vzorků získaných po 240 h.

Během prvního dne měření došlo u většiny xenobiotikem ošetřených rostlin k viditelnému snížení hodnot TFC oproti kontrole, s určitou výjimkou v případě použité koncentrace 50 μM (V3, 24 hod). Po dalších 24 h se nicméně množství flavonoidů u všech stresovaných variant zvýšilo a u salátu, kde byl aplikován 500 μM roztok (V4, 48 h), bylo jejich množství větší ve srovnání s neošetřenými jedinci.

U nejnižší použité koncentrace paracetamolu (5 μM , V2) docházelo u jednorázové aplikace od 72 h dál, k nárůstu TFC po zbývající dobu experimentu. Výjimku tvoří 240 h, kdy byl obsah flavonoidů nízký jak oproti předchozímu, tak i následujícímu odběru, a tento pokles je pozorován i u kontrolní varianty. Nicméně hodnota TFC byla stále vyšší ve srovnání s kontrolou, což platilo i u ostatních odběrů (72-336 h). U chronické dávky při použití koncentrace 5 μM nebyl výrazný rozdíl mezi ní a akutní. V dalších intervalech hodnocení, s

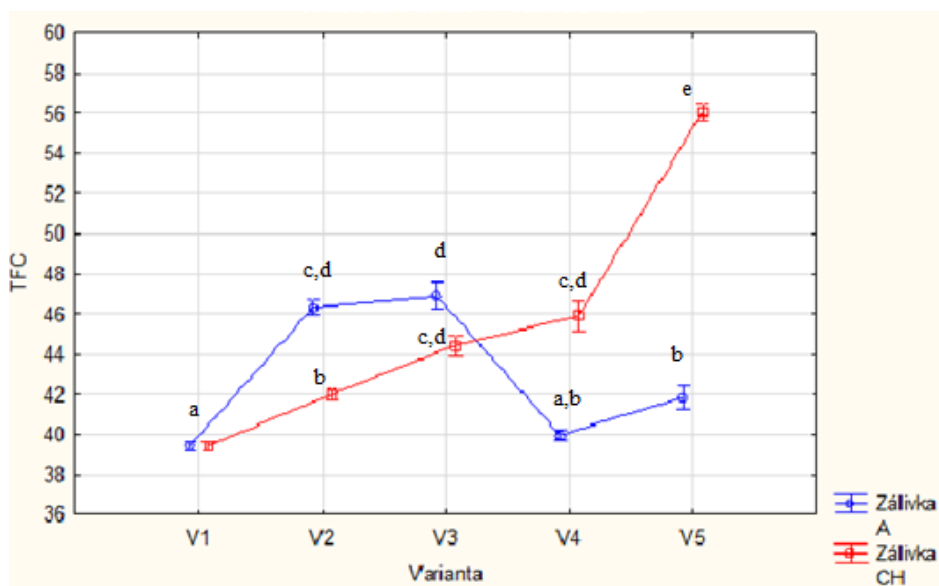
výjimkou 240 h, bylo množství flavonoidů spíše menší, ale opět bylo vyšší než u neošetřených salátů.

U varianty 3 (50 μ M) bylo rovněž po prvních třech dnech pozorováno zvýšení TFC u jednorázové zálivky ve srovnání s kontrolou, s výjimkou odběru po 168 h. Celkově byl obsah po jedné aplikaci paracetamolu kolísavý a nejvyšší po 240 h. U chronického vystavení docházelo po 72 h k pozvolnějšímu navýšení TFC až do konce experimentu oproti kontrole, které až na 168 h bylo spíše menší než v případě akutního působení.

Z Graf 1 vyplývá, že TFC byl také zvýšen u V4 (500 μ M), ve srovnání s neošetřenými variantami, po 72 h u jednorázové zálivky s maximem po 240 h. V případě posledního odběru nebyl pozorován rozdíl. U opakované zálivky paracetamolem došlo nejprve opět k poklesu TFC po 72 a 168 h, jak proti kontrole, tak předchozím měřením (V4, 48 h) a prvním způsobu zálivky. V posledních dvou odběrech, byl ale již nárůst patrný a hodnoty TFC po 336 h přesahují ty u jednorázové zálivky.

Při nejvyšší jednorázově aplikované koncentraci paracetamolu (5 mM; V5) došlo po prvotním poklesu ke zvyšování TFC v prvních třech dnech ve srovnání s kontrolou. Následovalo opět kolísání obsahu flavonoidů, který byl ale v případě 240 h o něco vyrovnanější. Stejně jako v případě V4, tak i chronická zálivka způsobila po 72 h nejprve pokles, který se ještě prohloubil po 168 h. Po 10 a 14 dnech od začátku experimentu byl ale zjištěn opětovný nárůst TFC, jak proti kontrole, tak postupně i ostatním variantám a jednorázové aplikaci.

Graf 2 ukazuje TFC na konci experimentu po aplikaci roztoků v obou režimech zálivek. Se zvyšující se koncentrací paracetamolu (V2-V5) se u akutní varianty obsah flavonoidů po aplikaci 5 μ M roztoku významně zvýšil v porovnání s chronickou zálivkou a kontrolou. U vyššího množství paracetamolu statisticky výrazný nárůst, až na V4, byl pouze oproti kontrole. Naopak po opakované aplikaci 500 μ M a 5 mM zálivky se TFC u těchto variant významně zvýšil ve srovnání s kontrolou i jednorázovým ošetřením, jak bylo popsáno výše.



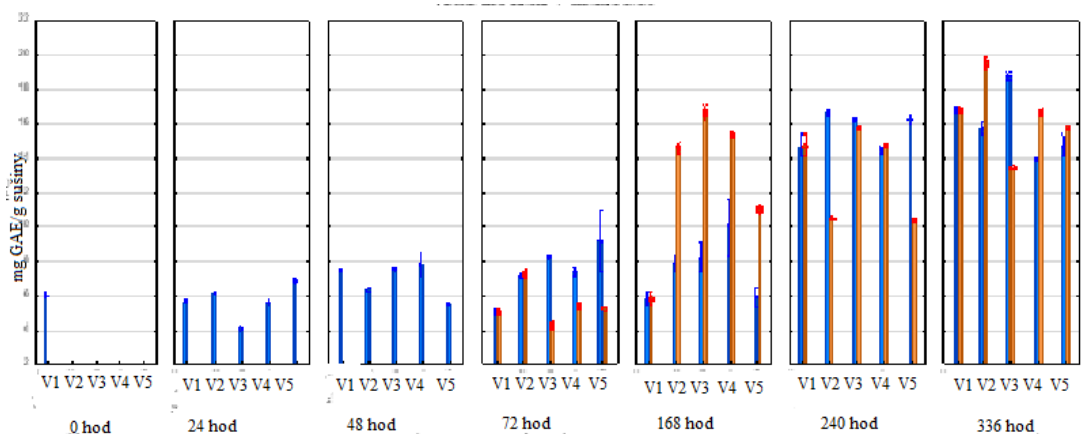
Graf 2 - Celkový obsah flavonoidů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, \pm SD, $F(4,20) = 131$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p < 0,05$. V1=kontrola, V2=5 μ M, V3=50 μ M, V4=500 μ M a V5=5 mM.

5.1.2 Stanovení celkových fenolů

Na Graf 3 je uveden celkový obsah fenolů (TPC) u salátu v závislosti na působení stresu paracetamolem, kterému byly rostliny vystavené pomocí akutní a chronické zálivky. Nejvyšší hodnota byla naměřena po opakované aplikaci 5 μ M roztoku po 336 h. Nejnižší hodnota byla naměřena také u chronické zálivky, a to u V3 (50 μ M koncentrace) po 72 h. Vzhledem k tomu, že na základě provedené statistiky je hodnota p menší než 0,05, existuje statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu fenolů mezi měřnými vzorky.

Na grafu lze také vidět, že dochází k postupnému navýšení TPC jak u kontrolních, tak u vzorků ošetřených paracetamolem. U jednorázové zálivky byl ve většině sledovaných odběrů pozorovatelný nárůst obsahu fenolických látek, v porovnání s kontrolou, po aplikaci 5-500 μ M roztoků. V některých sledovaných intervalech byl ale u těchto variant zaznamenán podobný nebo i nižší TPC (V2, 24 h; V4, 240 h; V2, V4, 336 h). V případě použití nejvyšší koncentrace (V5) bylo v jednotlivých odběrech zjištěno, že jsou zde hodnoty TPC v sušině poměrně kolísavé.

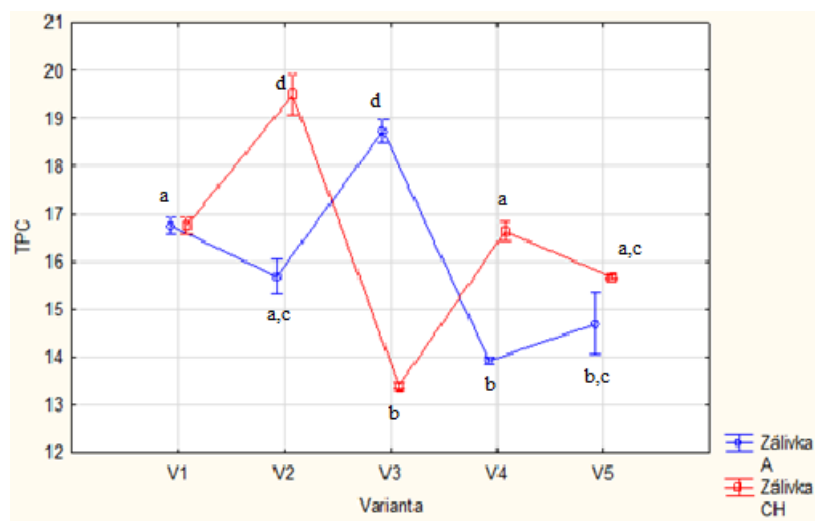
V případě chronické zátěže obsah celkových fenolů v průběhu měření rovněž nevykazoval jednoznačnou závislost na zvyšující se koncentraci použitých roztoků paracetamolu. Po druhé aplikaci došlo k nárůstu pouze u V2 (5 μ M, 72 h), zatímco u ostatních variant byl TPC ve srovnání s kontrolou nižší nebo srovnatelný. Viditelný nárůst obsahu fenolických látek u všech paracetamolem ošetřených rostlin byl následně sledován po 168 h, kdy byl větší i ve srovnání s jednorázovou zálivkou. V následujících odběrech se pak tento rozdíl spíše srovnal, a s výjimkou V2 a V4 (336 h) byly hodnoty TPC u salátu, chronicky vystavenému tomuto stresu, menší nebo srovnatelné s akutní aplikací a kontrolou.



Graf 3 - Stanovení celkového obsahu fenolů po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μ M, V3 = 50 μ M, V4 = 500 μ M, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření \pm SD, (F,12 102)=26,452, p=0,0000.

Graf 4 ukazuje TPC opět na konci experimentu po aplikaci jak jednorázové, tak i opakované zálivky. Se zvyšující se koncentrací paracetamolu (V2-V5) kolísají hodnoty jak u akutní varianty, tak chronické. Obsah fenolů po jednorázové aplikaci 50 μ M roztoků byl statisticky vyšší v porovnání s ostatními variantami, s výjimkou chronické zálivky V3. U rostlin ošetřených zbylými koncentracemi (V2, V4 a V5) byl zaznamenán spíše úbytek fenolů oproti kontrolnímu vzorku.

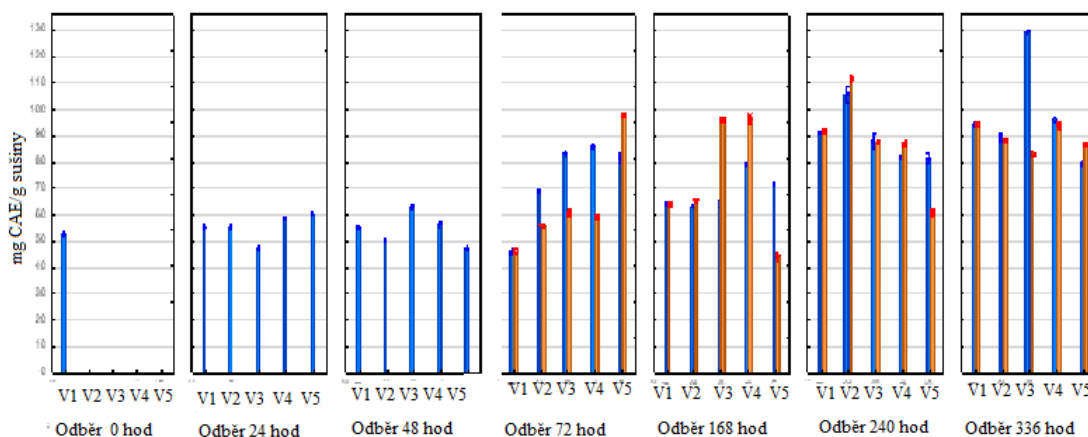
U chronické zálivky došlo k významnému zvýšení TPC již po aplikaci paracetamolu nejnižší koncentrace oproti ostatním variantám, kde takový vliv neměl. Naopak po opakované aplikaci 50 μM (V3) byl naměřen nejmenší obsah fenolických látek, který se ale výrazněji nelišil od jednorázové zálivky V4 a V5.



Graf 4 - Celkový obsah fenolů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, \pm SD, $F(4,20) = 71,30$, $p=0,00000$, kde byly rozdily mezi skupinami za statisticky významné, když $p < 0,05$. V1=kontrola, V2=5 μM , V3=50 μM , V4=500 μM a V5=5 mM.

5.1.3 Stanovení celkových fenolických kyselin

Graf 5 ukazuje celkový obsah fenolických kyselin (PAC) u salátu po aplikaci jednorázové a opakované dávky paracetamolu v závislosti na koncentrační řadě. Nejvyšší hodnota byla naměřena u jednorázově aplikovaného 50 μM roztoku po 336 h. Nejnižší hodnota byla naměřena naopak u chronické zálivky při 5 mM koncentraci po 168 h. Na grafu je vidět, že obsah PAC se u stresovaných rostlin (V2-V5), až na výjimky, spíše zvyšoval oproti počátku (V1, 0 h). Vzhledem k tomu, že na základě provedené statistiky je hodnota p menší než 0,05, existuje statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu fenolických kyselin mezi měřeními vzorky.



Graf 5 - Stanovení celkového obsahu fenolických kyselin po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μM , V3 = 50 μM , V4 = 500 μM , V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření \pm SD, $(F,12\ 102)=187,54$, $p=0,0000$.

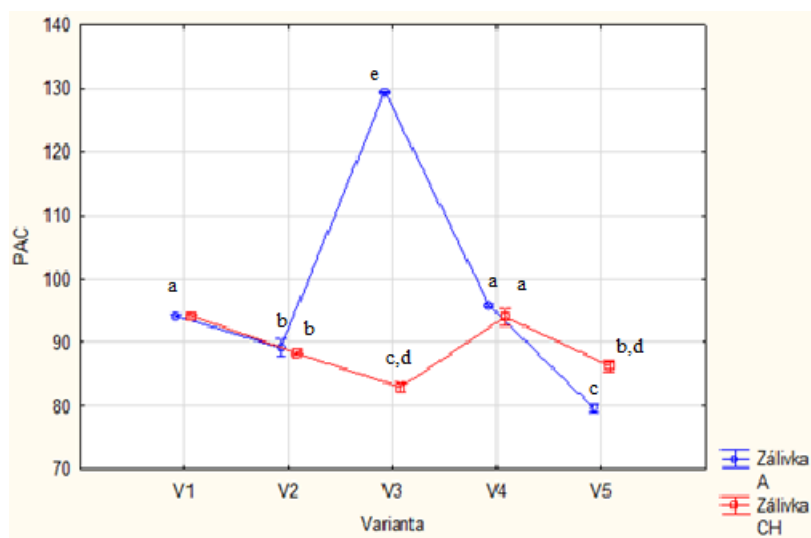
U kontrolního vzorku (V1) během prvních dvou dnů nedošlo k výrazným změnám. Mírný pokles PAC byl pozorován po 72 h, ale v dalších odběrech se postupně obsah těchto metabolitů zvýšil.

V průběhu prvních dvou dnů nebyly rozdíly PAC u paracetamolem ošetřených vzorků oproti neošetřeným tak viditelné, jako v případě např. TFC. Po 24 h hodnoty obsah fenolických kyselin u V3 (50 μM) spíše klesl, ale už po 48 h byl vyšší ve srovnání s kontrolou. U odběru po 72 h v případě jednorázové kontaminace substrátu se PAC zvýšilo i s narůstající koncentrací paracetamolu, což bylo pozorováno i chronické zálivky. V ostatních intervalech docházelo spíše ke kolísání hodnot PAC u obou způsobů zatížení, kdy s výjimkou V3, V4 a V5 (168 h), V5 (240 h) a V3 (336 h) nebyl příliš rozdíl mezi jednorázovým a opakovaným zatížením.

U nejnižší koncentrace (V2) docházelo ke kolísání hodnot, jak u chronické, tak akutní zálivky, i když u některých odběrů se hladina PAC držela u podobných hodnot jako kontrola, jako např. u odběru při 24 h nebo 168 h. Hodnoty PAC u opakované dávky a jednorázové jsou si podobné. U následující jednorázově aplikované koncentrace (V3) docházelo k postupnému zvyšování hladiny fenolických kyselin až do odběru při 168 hodin, kde se PAC nelišily od kontroly, ale následně jejich obsah opět rostl. U chronické zálivky docházelo k nárůstu PAC hned ze začátku po 168 h, kdy jejich obsah začnul pomalu klesat pod hodnoty kontrolní.

Na grafu lze pozorovat, že u V4 (500 μM) se po prvních 48 hodinách se obsah PAC nemění, jak již bylo zmíněno výše. K jejich nárůstu docházelo při dalším odběru (72 h) a při posledním odběru (336 h). U chronické zálivky docházelo nejprve k navýšení obsahu PAC v porovnání s jednorázovou, ale při dalších odběrech se jejich obsahy srovnávaly. U nejvyšší koncentrace (V5) docházelo opět ke kolísání hodnot u akutní zálivky, stejně tak i u chronické.

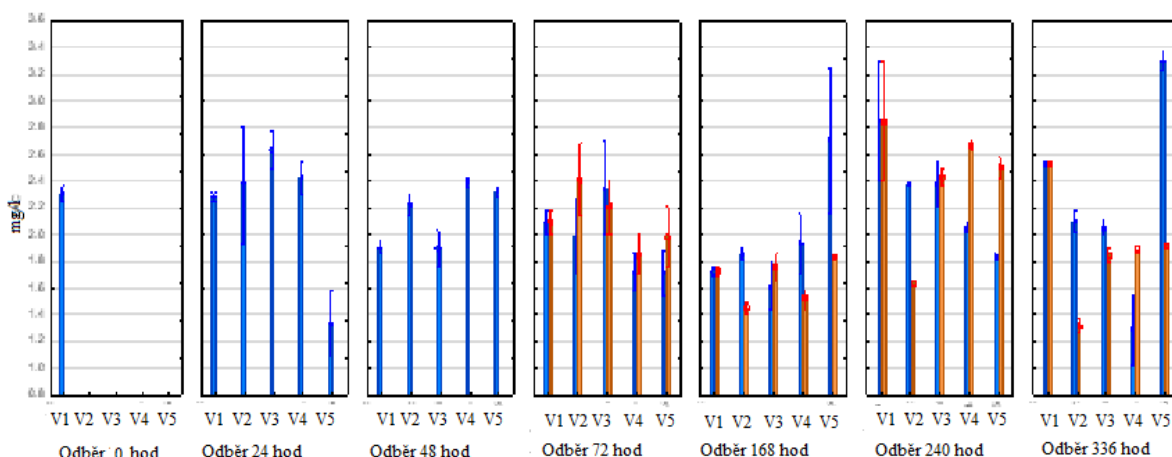
Na Graf 6 je znázorněn PAC na konci experimentu po aplikaci jak jednorázové, tak i opakované zálivky. V obou provedeních došlo, s výjimkou V4, ke statisticky významnému snížení PAC po aplikaci testovaných roztoků. Pouze u koncentrace 50 μM , v rámci sledování akutního stresu, byl obsah fenolických kyselin významně zvýšen.



Graf 6 - Celkový obsah fenolických kyselin po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, \pm SD, $F(4,20) = 387,54$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p < 0,05$. V1=kontrola, V2=5 μM , V3=50 μM , V4=500 μM a V5=5 mM.

5.1.4 Stanovení celkových anthokyaninů

Na Graf 7 je uveden celkový obsah anthokyaninů u salátu v závislosti na působení stresu paracetamolem vystaveného rostlině pomocí akutní a chronické zálivky. Nejvyšší hodnota byla naměřena u jednorázové koncentrace 5 mM po 336 h. Nejnižší hodnota byla naměřena naopak právě při 5 mM koncentraci po 24 h. Vzhledem k tomu, že na základě provedené statistiky je hodnota p menší než 0,05, existuje statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu anthokyaninů mezi měřenými vzorky.



Graf 7 - Stanovení celkového obsahu anthokyaninů po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μ M, V3 = 50 μ M, V4 = 500 μ M, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření \pm SD, ($F,12\ 102$)=4,2794, $p=0,0000$.

U kontroly (V1) došlo k postupnému snižování obsahu během prvních dvou dnů. Hodnota TAC klesla u kontroly nejnižše při odběru 168 h. Největší nárůst nastal mezi 168 h a 240 h, ale při dalším odběru byl opět zjištěn pokles a celkový obsah anthokyaninů se příliš nelišil od prvního odběru.

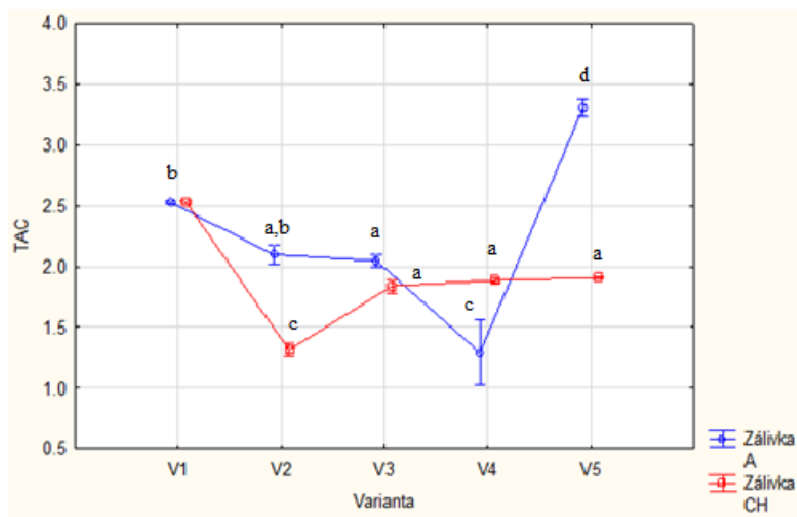
U dvou nejnižších použitých koncentrací paracetamolu (V2 a V3) vyplývá z grafu stejný trend jako u V1, s výjimkou nárůstu TAC po 24 h. U dalších dvou odběrů docházelo k poklesu obsahu anthokyaninů, kdy poté opět nastal nárůst při 240 h a následný pokles u jednorázové zálivky. Hodnoty TAC byly v posledních dvou odběrech u V2 a V3 v porovnání s kontrolou nižší. U opakované dávky paracetamolu nastal podobný průběh, s výjimkou u V2 v 72 h, avšak hodnoty TAC byly mnohem nižší než u akutní zálivky (V2), případně ne tak rozdílné (V3).

U koncentrace 500 μ M (V4) došlo k poklesu TAC při odběru 72 hod po opětovném ošetření paracetamolem. V následujícím odběru bylo u jednorázové zálivky pozorováno mírné zvýšení anthokyaninů oproti kontrole, ale jak po 240, tak i 336 h byl TAC ve srovnání s neošetřenými vzorky menší. Rovněž u chronické zálivky nastal pokles obsahu anthokyaninů po 72 hod srovnatelný s jednorázovou aplikací, který se ještě více projevil po 168 h. Při dalších odběrech ale obsahovaly vícenásobně ošetřené rostliny více TAC než u akutní varianty, toto množství však bylo ve srovnání s kontrolou nižší.

U nejvyšší koncentrace (V5, 5 mM) nastal po 168 a 336 h výrazný nárůst TAC u jednou ošetřených rostlin, zatímco u odběrů po 72 a 240 h byl obsah těchto látek oproti kontrole menší. V rámci chronické aplikace se u příslušných vzorků množství anthokyaninů příliš

nezměnilo nebo bylo jako v případě posledních dvou odběrů také menší při porovnání s kontrolou. Nicméně byl TAC po 240 h vyšší u chronicky ošetřené varianty než u akutní.

Na grafu 8 je vidět TAC na konci experimentu, kdy ukazuje, že u akutní varianty se TAC významně snížil se zvyšující se koncentrací paracetamolu (V3, V4). Nicméně u nejvyšší koncentrace (V5) došlo k výraznému nárůstu TAC jak ve srovnání s kontrolou (V1), tak i se zbylými ošetřenými rostlinami, jednorázově i kontinuálně. Graf dále ukazuje, že u chronické zálivky nastalo snížení TAC u všech variant koncentrací, ale 5 μ M roztok způsobil největší pokles, srovnatelný s V4 u jednorázového ošetření. Ostatní koncentrace se s výjimkou kontroly mezi sebou nelišily.



Graf 8 - Celkový obsah anthokyaninů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, \pm SD, $F(4,20) = 31,261$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p < 0,05$. V1=kontrola, V2=5 μ M, V3=50 μ M, V4=500 μ M a V5=5 mM.

5.1.5 Stanovení antioxidační aktivity

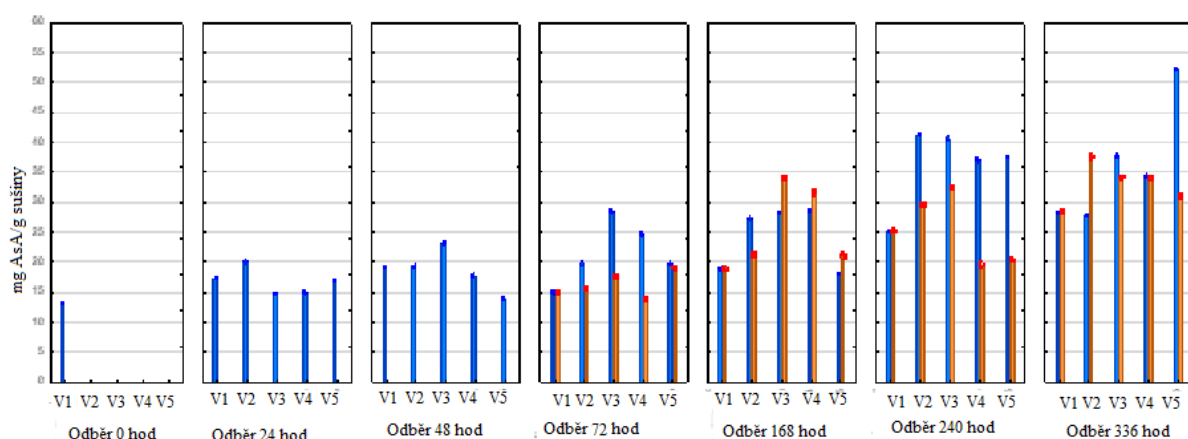
Na grafu 9 je uvedena antioxidační kapacita (PAP) u salátu u kterého byla aplikován paracetamol v jednorázové nebo chronické dávce v závislosti na rostoucí koncentrační řady. Nejvyšší hodnota byla naměřena u koncentrace 5 mM po 336 h u akutní zálivky. Nejnižší hodnota byla naměřena naopak právě u kontroly na začátku experimentu. Vzhledem k tomu, že na základě provedené statistiky je hodnota p menší než 0,05, existuje statisticky významný rozdíl v antioxidační kapacitě mezi měřenými vzorky.

Kontrola (V1) v prvních dvou dnech postupně u jednorázové zálivky rostla a po poklesu při následném odběru (72 h) měla dále opět rostoucí tendenci. U nejnižší koncentrace (V2) dochází k nárůstu až po odběru 168 h, kdy předcházející tři odběry byla hodnota stejná, přesto byla při 24 a 72 h vyšší než kontrolní. PAP následně vzrostla i při odběru 240 h, ale při posledním se snížila na úroveň kontroly (336 hod) klesá. Rostoucí trend v průběhu času je z grafu patrný i u chronické zálivky V2, kdy je sice nižší ve srovnání akutní, ale po 336 h je ve srovnání s kontrolou vyšší.

Rostoucí tendenci byla zaznamenána až do odběru při 240 hodinách u dalších dvou koncentrací (V3 a V4) u jednorázové zálivky, kdy dochází k mírnému poklesu až během posledního odběru. U chronické dávky paracetamolu došlo k nárůstu při 168 hod a poté k následnému poklesu hodnot PAP. Při posledním odběru došlo k opětovnému nárůstu.

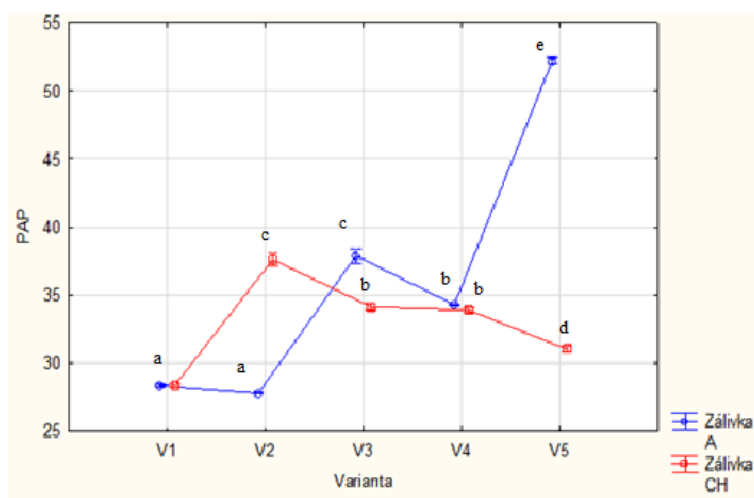
Hodnoty u koncentrace 50 μM (V3) vykazovaly větší antioxidační aktivitu než u 500 μM (V4). Stejně tak u chronické zálivky jsou hodnoty PAP vyšší u nižší koncentrace (V3), s výjimkou poslední odběru, kdy se hodnoty vyrovnávají.

U nejvyšší koncentrace nebyl pozorován výraznější nárůstu PAP až do odběru při 168 h, kdy se poté zvýšil PAP u jednorázové zálivky jak proti kontrole, tak i chronické zálivce. K nárůstu došlo i u chronické zálivky při 336 h ale k výrazně menšímu než u akutní zálivky. V předcházejících odběrech byla PAP, až na 240 h, ve srovnání s neošetřenými rostlinami vyšší.



Graf 9 - Stanovení antioxidační aktivity po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μM , V3 = 50 μM , V4 = 500 μM , V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření \pm SD, $(F, 12, 102)=564,83, p=0,0000$.

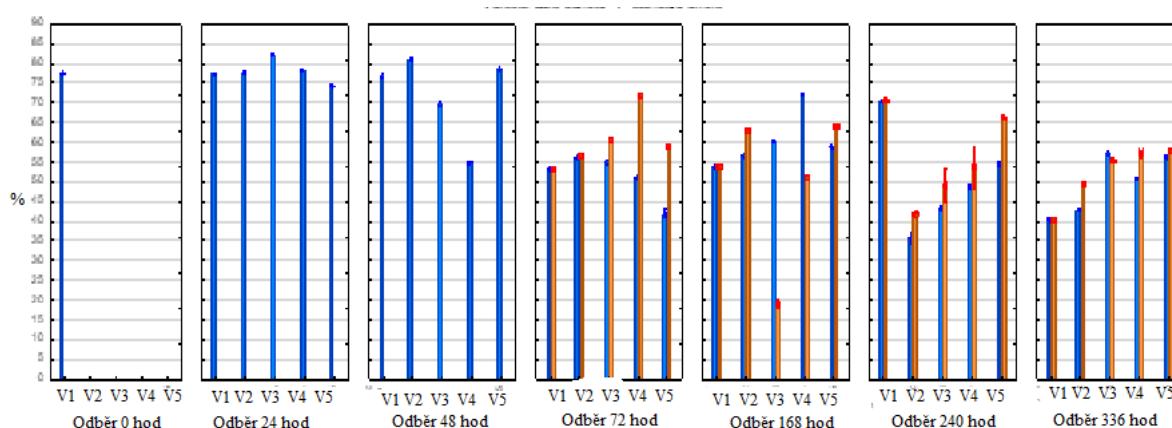
Na grafu 10 je vidět PAP na konci experimentu po aplikaci jak jednorázové, tak i opakované zálivky. Ukazuje nám, že u akutní zálivky došlo ke zvýšení PAP se stoupající koncentrací paracetamolu. Nejvíce antioxidační aktivitu ovlivnila 5mM (V5) koncentrace roztoku, nejméně 5 μM (V2), která se statisticky nelišila od kontroly. Graf dále ukazuje, že vlivem chronické zálivky nastal naopak u V2 výrazný nárůst oproti neošetřeným rostlinám. PAP rovněž významně zvýšila i opakovaná aplikace ostatních roztoků (V3-V5), jejich účinek byl však ve srovnání s V2 menší a měl klesající trend.



Graf 10 - Celkový obsah anthokyaninů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3, \pm$ SD, $F(4,20)=850,74, p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 μM , V3=50 μM , V4=500 μM a V5=5 mM.

5.1.6 Vychytávání peroxidu vodíku

Na grafu 11 je uvedena aktivita vychytávání peroxidu vodíku u salátu v závislosti na působení stresu paracetamolem vystaveného rostlině pomocí akutní a chronické zálivky. Nejvyšší hodnota byla naměřena u koncentrace 50 μM (V3) po 24 h. Nejnižší hodnota byla pozorována u opakovaně aplikovaného roztoku stejné koncentrace po 168 h. Vzhledem k tomu, že na základě provedené statistiky je hodnota p menší než 0,05, existuje statisticky významný rozdíl ve schopnosti vychytávat peroxid vodíku mezi měřenými vzorky.



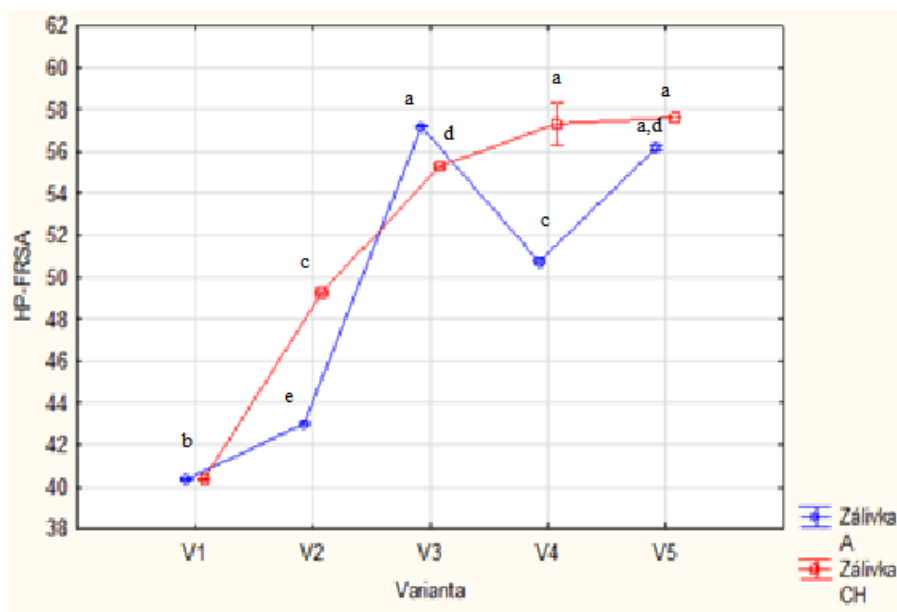
Graf 11 - Stanovení vychytávání peroxidu vodíku po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μM , V3 = 50 μM , V4 = 500 μM , V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření \pm SD. ($F, 12, 102$)=58,986, $p=0,0000$.

V průběhu sledovaného intervalu bylo zjištěno, že u kontrolních vzorků (V1) docházelo k postupnému poklesu schopnosti extraktu vychytávat H_2O_2 . Extrakty připravené ze sušiny salátu odebraného po 240 h měly HP-FRSA sice opět vyšší, ale u posledního měření byl sledován opět pokles aktivity.

U ošetřovaných rostlin (V3 až V5) byl průběh z počátku podobný, kdy do 72 h se zvyšující se koncentrací jednorázově aplikovaného paracetamolu HP-FRSA spíše klesala, kdy menší nárůst byl pozorován např. u V3 (24 h) nebo V2 a V5 (48 h). Od 168 h pak se stoupající koncentrací xenobiotika docházelo nárůstu aktivity vychytávání H_2O_2 . Ta byla sice menší než po 1 týdnu, ale s výjimkou 240 h byl sledován i nárůst oproti kontrole.

Toto zvýšení nastalo i u chronické zálivky, a to již po 72 h a aktivita byla většinou spíše vyšší nebo srovnatelná s jednorázovou zálivkou. Výjimku tvořil odběr 168 h, kdy u V3 a V4 nastal výrazný pokles oproti kontrole.

Graf 12 ukazuje HP-FRSA na konci experimentu po aplikaci jak jednorázové, tak i opakované zálivky. U akutního stresu došlo k významnému zvýšení HP-FRSA se zvyšující se koncentrací paracetamolu, kdy výrazně největší aktivita byla zaznamenána u rostlin ošetřených 50 μM a 5 mM roztokem. U zálivky s nejvyšší koncentrací byl sice menší pokles aktivity, ale nebyl od V3 statisticky významný. V grafu lze také pozorovat, že u chronické zálivky nastalo také postupné zvýšení hodnot HP-FRSA se zvyšující se koncentrací, které bylo oproti kontrole, a v případě V4 a V5 ve srovnání s V2 a V3, statisticky významné.



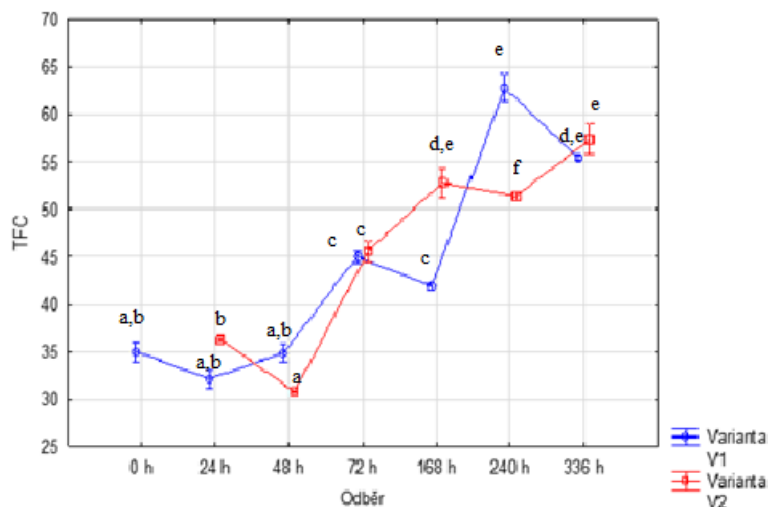
Graf 12 – HP-FRSA po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, $\pm SD$, $F(4,20)=68,443$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 μM , V3=50 μM , V4=500 μM a V5=5 mM.

5.2 Aplikace paracetamolu postřikem

5.2.1 Stanovení celkových flavonoidů

Na rozdíl od vzorků ošetřených pomocí zálivky, listy kontrolních rostliny (V1) v druhém experimentu, kde byl roztok paracetamolu aplikován foliárně (Graf 13), vykazovaly v průběhu měření postupné zvýšení TFC, kdy byl nárůst od 72 h statisticky významný a po 240 h dosáhl u kontroly maxima.

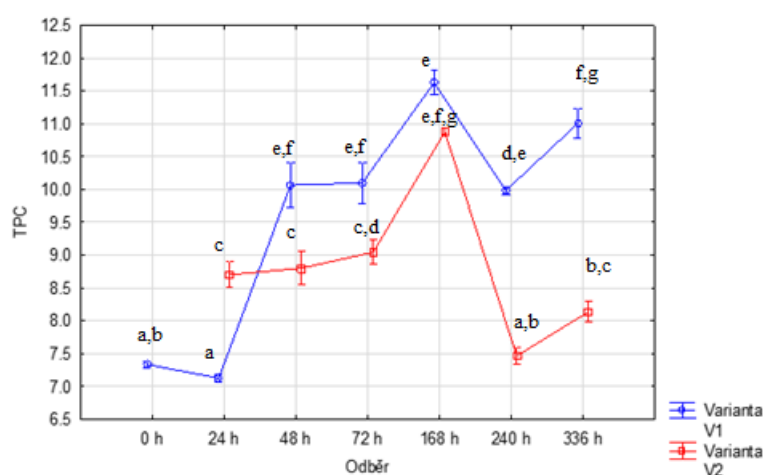
Podobný nárůst byl sledován i u varianty s paracetamolem (V2), kdy došlo po 48 h k nevýznamnému poklesu TFC oproti kontrole, a následně se obsah flavonoidů od 72 h také výrazně zvyšoval. Při posledním odběru pak mezi kontrolní a ošetřenou variantou nebyl statisticky významný rozdíl. V obou způsobech aplikace paracetamolu se ukazuje, že hladina celkových flavonoidů je v některých odběrech vyšší u stresovaných rostlin než u kontrolních.



Graf 13 - Celkový obsah flavonoidů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, $\pm SD$, $F(5,26)=30,95$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 mM.

5.2.2 Stanovení celkových fenolů

Rovněž u druhého způsobu ošetření salátu (Graf 14), kde byl paracetamol aplikován na listy přímo postřikem, jsou kontrolní hodnoty TPC (V1) vyšší než u stresovaných vzorků (V2). Obsah fenolických látek u stresovaných vzorků měla v průběhu pokusu podobný vzrůstající vývoj jako kontrolní rostliny s výjimkou odběru po 24 hodinách, kdy u nich byla hodnota význameně vyšší. Mezi vzorky V1 a V2 jsou statisticky významné rozdíly v téměř všech časech odběrů s výjimkou při 168 hod. Hodnoty TPC, avšak vykazovaly nižší hodnoty oproti metodě, kdy se paracetamol aplikoval pomocí zálivky. Rovněž mezi odběry 168 a 240 hodin dochází dokonce k snížení hodnot fenolů.

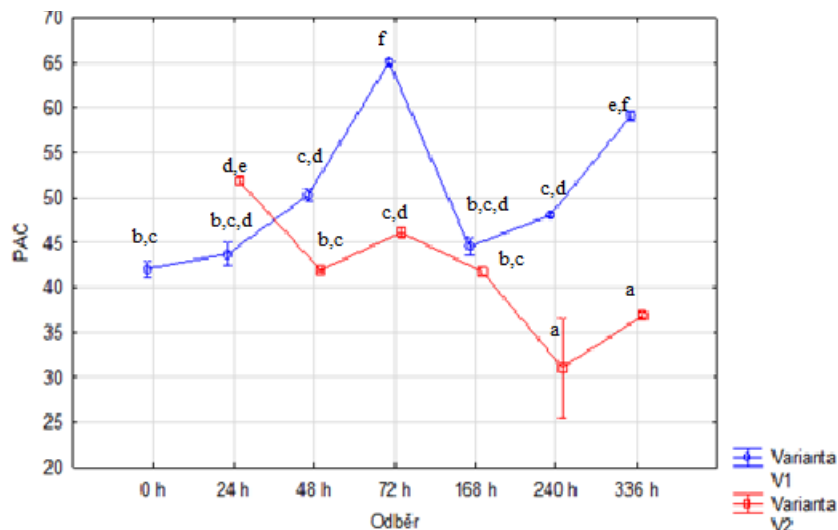


Graf 14 - Celkový obsah fenolů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, $\pm SD F(5,26)=33,001$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 mM.

5.2.3 Stanovení celkových fenolických kyselin

Kontrolní rostliny (V1) v druhém experimentu (Graf 15), kde byl roztok paracetamolu aplikován foliárně, vykazovaly nárůst PAC, ale po 168 h byl v listech zjištěn významný pokles oproti předchozímu měření. U posledního odběru byl opět pozorován nárůst, který se významně lišil od hodnot na začátku experimentu. U vzorků stresovaných paracetamolem (V2) došlo opět po prvotním (24 h) významném nárůstu PAC, v průběhu času k postupnému poklesu koncentrace kyselin jak proti odběru v 0 h, tak ve srovnání s kontrolou. Toto snížení PAC však bylo statisticky významné až po 240 h.

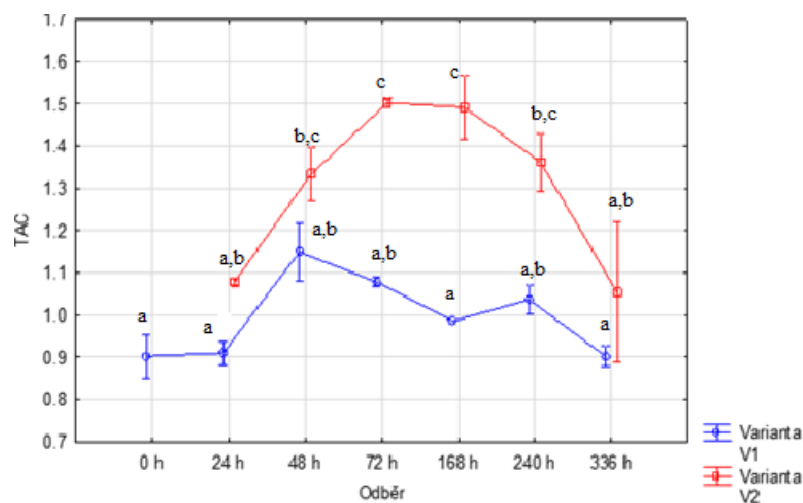
Obsah fenolických kyselin dosahuje nižších hodnot při aplikaci paracetamolu postřikem. U stresovaných rostlin dokonce nastal poklesu PAC pod počáteční hodnotu. Zatímco u zálivky mají tyto metabolity spíše vzrůstající nebo střídavě vzrůstající trend, u postřiku je trend klesající.



Graf 15 - Celkový obsah fenolických kyselin po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, $\pm SD F(5,26)=30,915$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 mM.

5.2.4 Stanovení celkového obsahu anthokyaninů

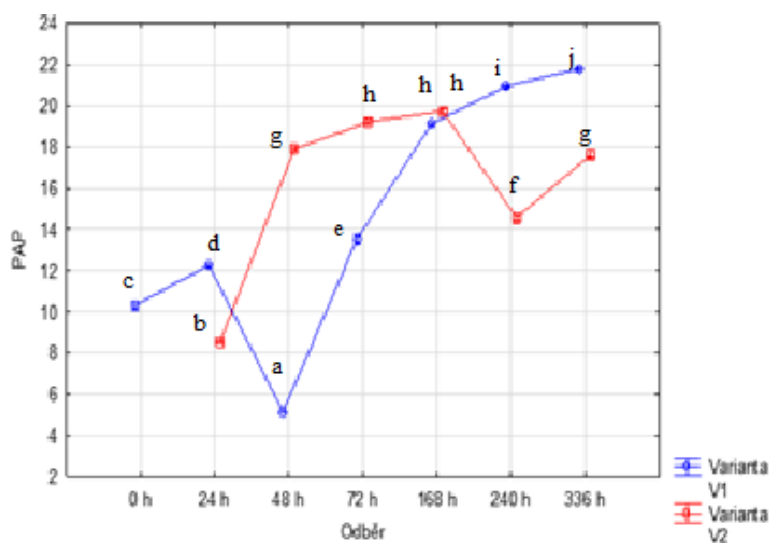
V rámci experimentu s foliárně aplikovaným paracetamolem (Graf 16) byl největší nárůst TAC pozorován u kontroly po 48 h a následně opět obsah anthokyaninů klesl. Z hlediska statistiky, však toto zvýšení obsahu nebylo významné a ani v rámci ostatních odběrů nebyl zjištěn výrazný rozdíl. U listů ošetřených postřikem došlo k nevýznamnému zvýšení koncentrace těchto metabolitů po 24 h, ale jejich obsah na rozdíl od kontroly dále rostl a dosáhl maxima po 72 h. Odběr v čase 240 h ukázal, že se TAC začal snižovat, což bylo viditelné i u posledního měření. Ošetřené vzorky tak měly podobný vývoj jako kontrolní, ale anthokyaninů se u nich vytvořila více, trend tak byl ve srovnání se záložkou lépe pozorovatelný.



Graf 16 - Celkový obsah anthokyaninů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, $\pm SD F(5,26)=2,7750$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 mM.

5.2.5 Stanovení antioxidační aktivity

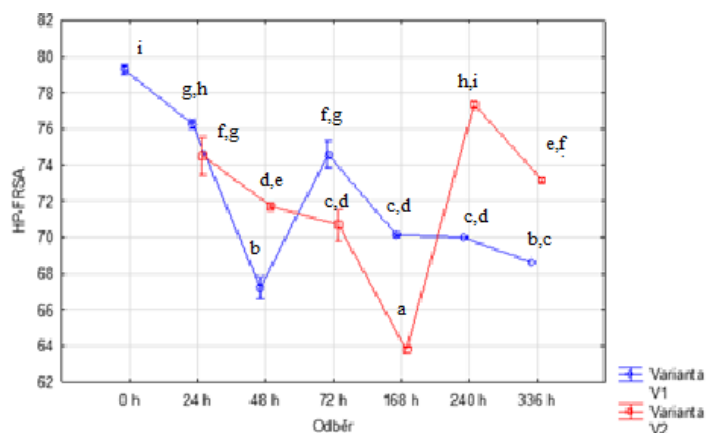
V rámci experimentu s postřikem paracetamolu (Graf 17) vykazovaly extrakty z kontrolních rostlin po 48 h výrazný pokles PAP oproti vzorkům se zálivkou (Graf 10). Nicméně po 72 h již došlo k statisticky významnému zvýšení antioxidační kapacity, které se postupně zvyšovalo až do konce experimentu. Hodnoty PAP byly v průběhu experimentu nižší než hodnoty stresovaných rostlin (V2) až do odběru 240 hodin. U stresovaných vzorků nastalo, po počátečním snížení (24 h) k nárůstu PAP, které dosáhlo maxima po 168 h. I přes nižší antioxidační kapacitu extraktů z následujících odběrů, byla stále významně vyšší než na začátku pokusu. Ve srovnání s kontrolou však byla PAP v posledních dvou měřeních menší, čímž se vzorky odlišovaly od těch při ošetření rostlin zálivkou.



Graf 17 – Stanovení antioxidační aktivity po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, $\pm SD F(5,26)=1831,1$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 mM.

5.2.6 Vychytávání peroxidu vodíku

N Podobně jako v případě pokusu, kde byl salát ošetřený pomocí zálivky, kontrolní rostliny (V1) v druhém experimentu (Graf 18), vykazovaly v průběhu měření pokles HP-FRSA, který však nastal už v prvních dvou dnech. Po 48 h se aktivita významně ještě více snížila ve srovnání s předchozím odběrem, následující den byla nicméně vyšší. Klesající, byť pozvolnější, trend HP-FRSA byl pozorován i u ošetřených rostlin salátu a po 168 h byla u nich naměřena vůbec nejmenší aktivita. Nicméně u dalšího odběru již byla opět zvýšená na úroveň na začátku pokusu. Aktivita vychytávání peroxidu sice v posledním odběru opět klesla, stále však byla výrazně vyšší ve srovnání s kontrolou (336 h), což bylo pozorováno i v experimentu se zálivkou.



Graf 18 – HP-FRSA po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, $n=3$, $\pm SD F(5,26)=231,3$, $p=0,00000$, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když $p<0,05$. V1=kontrola, V2=5 mM.

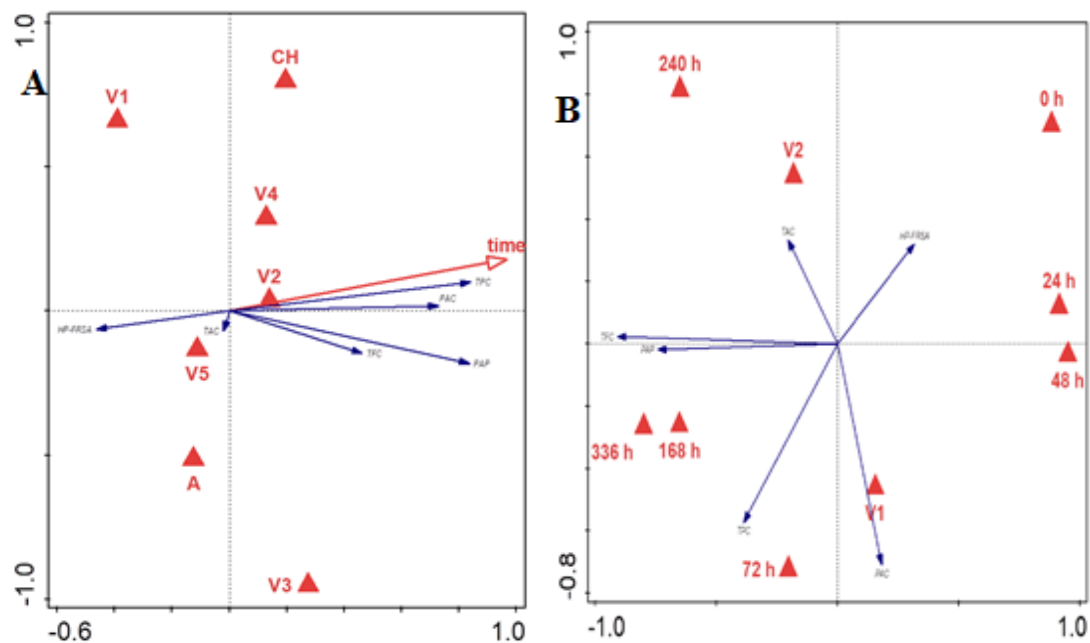
5.3 Analýza hlavních komponent

Graf 19 znázorňuje statistickou metodu zvanou analýza hlavních komponent (PCA). Tento graf ukazuje data transformovaná do dimenzí a ukazuje jejich trendy, kdy vztahy mezi jednotlivými složkami můžeme interpretovat pomocí šipek. Úhel, který šipky svírají, vyjadřuje korelaci mezi proměnnými.

Při bližším pohledu je vidět, že nejmenší úhel u zálivkových měření (Graf 19A) mezi sebou svírají PAP a TFC, dále pak PAC a TPC, z čehož vyplývá že tyto proměnné ve dvojici jsou navzájem silně korelované. O něco slabší je korelace mezi těmito čtyřmi znaky, přesto se dá označit jako stále silná korelace. Na grafu 19A je pozorovatelná slabá až nulová korelace mezi znaky TAC a TPC, kdy úhly mezi dvěma šipkami se blíží téměř 90°. Korelace poté lehce roste v pořadí PAC, PAP a TFC, kde se dá označit korelace mezi těmito dvěma proměnnými jako slabá. Nulová korelace je patrná z grafu mezi HP-FRSA a TPC, které svírají úhel téměř 180°. Korelace opět pak roste v pořadí PAC, PAP, TFC, přesto je úhel tak velký, že tyto proměnné spíše nekorelují. Za slabou korelací se dá označit naměřená data z HP-FRSA a TAC. Z grafu 19A je také patrné, které koncentrace jsou si svým účinkem podobné. Čím menší je vzdálenost mezi jednotlivými body, tím jsou si víc podobné. Zároveň je pozorovatelné, jaká koncentrace nejvíce byla ovlivněna proměnou. U koncentrací jsou si nejvíce podobné V2 (5 μM), V4 (50 μM) a V5 (5 mM), které se nacházejí v blízkosti sebe. V dolní část je vidět poslední koncentrace V3 (500 μM), která je osamocena od všech ostatních a je tedy rozdílná. V horním se pak nachází kontrolní složka (V1), která tedy taky není podobná se stresovanými vzorky. Z grafu 19A je taky patrné, že v mnoha parametrech se liší od sebe chronická a akutní zálivka.

Na grafu 19B je vidět, že u vzorků, u kterých byl paracetamol aplikován foliárně, nejmenší úhel mezi sebou svírají rovněž TFC a PAP. Tyto dvě proměnné byly jediné ze všech, co vykazovaly silnou korelaci. Zbylé TAC, HP-FRSA, TPC a PAC mají mezi sebou slabou např. TAC a HP-FRSA, TPC a PAC nebo PAP a TAC, anebo dokonce nulovou korelaci jako např. HP-FRSA a TPC, TAC a PAC. Z grafu 19B je také poznat, že některé časy odběru (0, 24 a 48 h nebo 168 a 336 h) jsou si podobné, zatímco jiné mají (např. 240 h a

72 h) jsou oproti zbytku rozdílné. Na grafu 19B je dále patrné, že stresovaná rostlina se však od kontrolní v mnoha parametrech liší.



Graf 19 - Analýza hlavních komponent (PCA). Symboly na PCA grafu (A) ukazují standardizované skóre na ose x a y pro koncentrační řadu od V1 (kontrola) po V5 (mM) včetně chronické a jednorázové zálivky, graf (B) je vyjádřením kontroly (V1) a stresovaného vzorku (V2) v rámci celého experimentu (od 0 h po 336 h). Vektorové souřadnice představují korelace mezi standardizovanými proměnnými (TPC – celkový obsah fenolů, TFC – celkový obsah flavonoidů, PAC – celkový obsah fenolických kyselin, TAC – celkový obsah anthokyaninů, PAP – antioxidační aktivitu a HP-FRSA – aktivitu vychytávání peroxidu).

6 Diskuse

Zemědělská produkce představuje důležitou vstupní bránu farmaceutických kontaminantů do potravinového řetězce kvůli vysoké poptávce po vodě z různých sladkovodních zdrojů a používání kompostu z čistírenských kalů. Farmaceuticky aktivní sloučeniny se mohou dostat do prostředí přes kanalizaci od pacientů, vypouštěním z farmaceutických výrobních zařízení a nesprávnou likvidací. Léčiva nejsou v těle úplně metabolizována, a proto mohou být eliminována z organismu v aktivní formě schopné vyvolat biologickou odpověď při velmi nízkých koncentracích (Marsoni et al. 2014).

Acetaminophen (paracetamol) je jedním z nejběžněji používaných analgetik v lidské medicíně, čímž se stává jednou z možných problémových farmaceutických sloučenin ve vodních tocích. Nicméně u savců je detoxifikován v játrech, kde při nízkých dávkách dochází k sulfataci a glukuronidaci, výsledkem je tvorba netoxického sulfátu a glukuronidového konjugátu. K intoxikaci dochází až po požití vysokých dávek léčiva, což může vést k vážným zdravotním komplikacím. Kontaminace vod a následná akumulace farmaceutik v životním prostředí může vést ke zvyšující se konzumaci nežádoucích látek skrze pěstované potraviny, například i hlávkového salátu (Crane et al. 2006; Schulte-Oehlmann et al. 2007)

Hlávkový salát, jak bylo popsáno v teoretické části, patří mezi nejoblíbenější zeleninu, která se konzumuje ve stále větším množství, protože je vnímána jako „zdravější“ potravina. Nedávné studie prokázaly pozitivní účinky hlávkového salátu při prevenci kardiovaskulárních onemocnění u potkanů a lidí (Llorach et al. 2008; Wu et al. 2015). Zdravé vlastnosti jsou připisovány velkému množství antioxidantních sloučenin, zejména vitamínu C a polyfenolů, stejně jako obsahu vlákniny. Polyfenoly (flavonoly a anthokyaniny) mají vyšší antioxidantní aktivitu třeba než vitamíny C a E a předchozí studie demonstrují důležitost chemické povahy těchto konjugátů, a naznačují, že stupeň hydroxylace určuje antioxidantní aktivitu a biologickou dostupnost. Kromě toho jsou antioxidantní sloučeniny závislé na rozdíly mezi odrůdami, pěstebními postupy, podmínkami zpracování a způsobu skladování (Llorach et al. 2008; Marsoni et al. 2014; Sharma et al. 2019).

Předložená diplomová práce byla zaměřena na porovnání vlivu paracetamolu na sekundární metabolismus lociky seté. Vypěstované rostliny byly vystaveny nejen různým koncentracím tohoto léčiva, ale i formou a způsobem aplikace. V provedených měřeních byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými variantami jak v rámci sledovaných obsahových látek (TPC, TFC, PAC, TAC), tak některých vlastností extraktu, jako je antioxidantní aktivita nebo jeho schopnost vychytávat peroxid vodíku.

6.1 Porovnání mezi chronickou, akutní zálivkou a postříkem

6.1.1 Stanovení celkových flavonoidů (TFC)

Z naměřených hodnot TFC (Graf 1) vyplývá, že u kontrolních rostlin byl v průběhu experimentu, naměřen proměnlivý obsah celkových flavonoidů. Obsah naměřených TFC pro akutní a chronickou zálivku v rozsahu 5 μ M-5 mM, odpovídá výsledkům Shin et al. (2020), kteří u lociky seté stanovovali TFC v rámci stresu navozeného zasolením. Z našich výsledků

vyplývá, že při jednorázové zálivce rostl celkový obsah flavonoidů v porovnání s kontrolou. Zatímco u nižších koncentrací (5 a 50 μM) se zdál být účinek ještě stimulující, u vyšších koncentrací je již hladina TFC nižší. Nikzad & Parastar (2021) publikovali výsledky, kdy kontrolní rostliny měly vyšší TFC než stresované. Jako kontaminant byla použita směs parabenů a léčiv (gemfibrozilu, diklofenaku, naproxenu, karbamazepinu a kyseliny mefenamové) v koncentrační řadě (10, 100, 500 $\mu\text{g/l}$) při akutní, jednorázové, aplikaci po dobu 14 dní. Z jejich výsledků je patrné, že při zvyšující se koncentraci léčiva došlo ke snižování vyplavování flavonoidů v závislosti na zvyšující se koncentraci induktorů. Ovšem z naměřených výsledků v této práci pozorujeme opačný jev při akutní zálivce při porovnání s kontrolou (Graf 2). Tento trend může být způsoben použitím vyšších koncentrací v našich experimentech.

U chronické zálivky lze sledovat vzestupnou tendenci, kdy TFC roste se zvyšující se koncentrací paracetamolu. U vzorků ošetřených pomocí postřiku (Graf 13) je trend zcela jiný. Hladina celkových flavonoidů v průběhu měření vzrůstala a hodnota TFC kontroly je vyšší po 336 h než po prvním odběru. Stejně tak u stresované rostliny, která kopíruje trend kontroly.

6.1.2 Stanovení celkových fenolů (TPC)

Z výsledných hodnot TPC (Graf 3) lze říct, že došlo k prokazatelnému nárůstu celkových fenolů a kontrolní hodnoty tzn. TPC byly vyšší po 336 h než v 0 h. Opačný výsledek publikoval Shin et al. (2020), kde kontrolní hodnoty i rostliny stresované (ošetření NaCl) měly hodnoty nižší v porovnání s kontrolou. Rovněž Rajabbeigi et al. (2013) uvedl, že ani sucho nebo záření (UV-B), případně kombinace obou faktorů, nemělo vliv na TPC u salátu. Nicméně tyto stresory celkový obsah fenolů zvyšovat mohou, byť tento vliv byl zkoumán u třezalky (De Abreu & Mazzafera 2005). Lze říct, že fenolické látky působí proti stresu u rostlin, ale syntetizují se v závislosti na stresovém faktoru. Zvyšování TPC může souviset i s jejich akumulací v buněčných stěnách, které jsou součástí obranných reakcí souvisejících s lignifikací, ke které dochází při různých biotických i abiotických stresových podmínkách (Galieni et al. 2015).

Ve výše zmíněné studii Nikzad & Parastar (2021) byl TPC rovněž zkoumán a při koncentraci léčiv (gemfibrozilu, diklofenaku, naproxenu, karbamazepinu a kyseliny mefenamové) 100 μM , byly hodnoty fenolických látek vyšší než u kontrolního vzorku. Oproti tomu rostliny s koncentrací jejich léčiv 10 a 500 μM , dosahovaly nižších hodnot TPC v porovnání s kontrolou. To se shoduje s akutní zálivkou u koncentrace 50 μM (336 h), kdy byly hodnoty TPC větší než u kontroly (Graf 4).

Předchozí studie prokázaly, že mezi tři nejdůležitější fenolické sloučeniny v salátu patří kvercetin-3-glukoronid, kyselina kaffeoylchinová a kyselina kaffeoylvinná. Vzhledem k přítomnosti těchto fenolických sloučenin, může být různý obsah v závislosti na použitých koncentracích kontaminace ve vzorcích salátu přičítán proměnlivému obsahu těchto sloučenin (Galieni et al. 2015).

Tento předpoklad koreluje s našimi výsledky, kdy pro odběr při 168 h pozorujeme vzrůstající obsah fenolů (v porovnání s kontrolní rostlinou) v závislosti na rostoucí koncentraci léčiva (5 μM - 5 mM) a to jak u chronické, tak u akutní aplikace stresového faktoru. Stejný výsledek obdrželi u studie Kummerová et al. (2016), kdy ošetřovali rostlinu

Lemna minor, farmaceutikem diklofenak (337 pM, 33 nM, 337 nM) a paracetamol (661 pM, 66 nM a 662 nM), ovšem měření bylo provedeno pro odběr po 240 h. Pro naše měření jsme při oběru po 240 h naměřili proměnlivý obsah fenolů, a to jak u chronické, tak u akutní zálivky v porovnání s kontrolou. Tento rozdíl může být způsoben použitím rozdílné koncentrace léčiva. Pro naše stanovení byla použita několikanásobně vyšší koncentrace paracetamolu než ve studii Kummerová et al (2016) a tím mohl být navozen rychlejší vzrůst fenolů v kratším čase po aplikaci farmaceutika než ve zmiňované studii.

Na druhou stranu musíme pečlivě zvážit možnou interakci mezi použitými činidly a aplikovanými sloučeninami. Například Gouda et al. (2013) publikovali pomalou reakci mezi Folin-Ciocalteuovým činidlem a paracetamolem. Podobné výsledky byly zjištěny pro diklofenak. Neznáme však všechny detoxikační produkty studovaných léčiv v rostlinách, které mohou mít schopnost interagovat s tímto činidlem.

6.1.3 Stanovení celkových fenolických kyselin (SAC)

Fenolové kyseliny jsou sekundární metabolity rostlin, které se běžně vyskytují v potravinách rostlinného původu. Substituované deriváty hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny jsou převládajícími fenolovými kyselinami v rostlinách. Jak již bylo řečeno výše fenolové kyseliny společně s flavonoidy jsou důležité sekundární metabolity, o kterých se předpokládá, že chrání rostlinu před abiotickými stresy, jako je zvýšená teplota. Tato ochrana spočívá v odstranění ROS dříve, než zoxidují buněčné stěny a membrány. Vzhledem k nedostatku odborné literatury zabývající se stanovováním fenolických kyselin po ošetření rostlin (konkrétně hlávkového salátu) různými farmaceutiky není možné adekvátně porovnat naměřené hodnoty v předložené diplomové práci. Nicméně ve studii Shamloo et al. (2017) vystavovali různé odrůdy pšenice stresu zvyšováním teploty (20, 25 a 30 °C), kdy byl zaznamenán zvyšující se obsah celkových fenolických kyselin se zvyšující se teplotou. Tento jev je s největší pravděpodobností způsoben prostřednictvím aktivace katalytických enzymů v rostlině. Je možné, že došlo k aktivaci katalytických enzymů i v případě našich výsledků. U chronické i akutní aplikaci paracetamolu při odběru po 72 h je patrné, že dochází ke zvyšujícímu se vyplavování fenolických kyselin v závislosti na zvyšující se koncentraci paracetamolu (5 μ M – 5mM). Zároveň tento jev může souviset s vyšším obsahem celkových fenolů. Dále z výsledků vyplývá, že pro hodiny odběru po 24 - 48 h a 240 - 336 h pro chronickou i akutní aplikaci paracetamolu, dochází k proměnlivému vyplavování fenolických kyselin v porovnání s kontrolou.

6.1.4 Stanovení antioxidační aktivity (PAP)

Z výsledků stanovení antioxidační aktivity vyplývá, že se antioxidační aktivita stanovená pomocí fosfomolybdenanové metody zvyšuje s vývojem a růstem salátu (Graf 9). U kontrolních rostlin je hodnota opět vyšší po 336 h než při prvním odběru. Dále lze říct, že u chronické zálivky antioxidační aktivita spíše klesá se zvyšující se koncentrací a aktivita je vyšší než u kontrolních rostlin, u jednorázové zálivky je to naopak – aktivita roste se zvyšující se koncentrací. Podobné výsledky prokázal i Leitao et al. (2021a), kde byly listy salátu vystaveny antiepileptiku karbamazepinu po dobu 15 dní. Antioxidační aktivita po 15 dnech byla největší u nejvyšší koncentrace (44,5 μ M) a celkově měla vzrůstající tendenci

v závislosti na koncentraci. Naopak Nikzad & Parastar (2021) publikoval, že nejvyšší antioxidační aktivitu, u vzorků salátu kontaminovaného skupinou parabenů a léků, měla koncentrace 100 μM . Kromě toho u kontroly byla PAP vyšší než zbylé koncentrace (10 a 500 μM). Lze tak říci, že dávka kontaminantu může hrát velkou roli ve schopnosti rostliny syntetizovat různé hladiny metabolitů.

Skutečnost, že v některých případech nemusí být u extraktu ze sušiny naměřena vyšší antioxidační aktivita, může být vysvětlena i dobrou regulací dalších obranných mechanismů a interakcemi enzymů a metabolitů, které zprostředkovávají reakci na oxidační stres. U listů salátů se ukazuje, že specifické enzymy jako jsou SOD, CAT a další, spolupracují na reakci ROS produkovaného oxidačním stresem indukovanými léčivy (Leitão et al. 2021b).

6.1.5 Stanovení anthokyaninů

Z výsledků vyplývá, že při jednorázové zálivce paracetamolem došlo k pozvolnému navyšování koncentrace anthokyaninů po ošetření paracetamolem. Podobný průběh byl zjištěn i u jiných autorů (Leitão et al. 2021a), kteří zkoumali vliv paracetamolu (6,6 μM a 33 μM) po jeho foliární aplikaci na listy salátu po dobu 0, 8 a 15 dnů, kdy se potvrzuje, že při abiotickém stresu se zvyšuje obsah anthokyaninů. Autoři zaznamenali pozvolný nárůst anthokyaninů v závislosti na rostoucí koncentraci paracetamolu v porovnání s kontrolou pro všechny stanovované dny. Tento trend byl pozorován i u našich výsledků (foliární aplikace), kdy jsme zaznamenali nárůst obsahu anthokyaninů v závislosti na zvyšující se koncentraci paracetamolu (5 μM – 500 μM) pro stanovení po 0 dnů (24 h), s výjimkou nejvyšší koncentrace (5 mM). A zároveň po 7 dnů (168 h) byl rovněž zjištěn nárůst anthokyaninů v závislosti na zvyšující se koncentraci léčiva. Oproti tomu při odběru 14 dnů (336 h) byl zaznamenán opačný výsledek s výjimkou při nejvyšší koncentraci paracetamolu (5 mM), než ve studii Leitao et al. (2021), nicméně ve zmíněné studii byla použita výrazně nižší koncentrace paracetamolu než v našem případě. Jeden z možných důvodů snížení obsahu anthokyaninů může být vazba glutathionu se vznikajícími komplexy anthokyaninů, což může vést k ovlivnění dostupnosti glutathionu pro účast v glutathion-askorbátovém cyklu a tím může docházet ke snížení tohoto metabolitu v listech salátu po ošetření paracetamolem.

Vyšší obsah anthokyaninů u stresovaných variant potvrdili i Mobin & Khan (2007), kde byl testován vliv kadmia, jako abiotického chemického stresoru. Vzhledem k tomu, že je tvorba anthokyaninů, stejně jako dalších fenolických látek závislá na aktivitě PAL, lze usuzovat, že přítomnost paracetamolu mohla činnost tohoto enzymu indukovat podobně jako jiné abiotické faktory (Leitão et al. 2021b).

Stanovení intoxikace salátu pomocí chronické zálivky ukazuje na grafu opětovné zvýšení anthokyaninů se zvýšenou koncentrací. Obsah anthokyaninů je však nižší než u jednorázové zálivky. Podobný efekt po aplikaci paracetamolu můžeme pozorovat u postřiků. U stresovaných vzorků je obsah vyšší než u vzorků kontrolních, čímž se také liší od zálivkových

6.1.6 Vychytávání peroxidu vodíku

H_2O_2 je důležitá signální molekula, která může způsobit poškození buněčných struktur. Působí ale také jako sekundární posel, který zprostředkovává komunikaci mezi kořeny a listy

roslin. Jak bylo uvedené v kapitole 3.3, abiotické stresy mohou způsobit indukci produkce ROS. Což potvrzuje studie Bigott et al. (2021), kteří stanovovali peroxid vodíku v listech a kořenech lociky seté po aplikaci nesteroidního antiflogistika diklofenaku. Tento jev může být způsoben apoplastickou akumulací ROS. Tento druh komunikace může aktivovat iontové kanály vedoucí k přílivu Ca^{2+} iontů do cytoplasmy. V konečném důsledku spuštění ROS- Ca^{2+} signální dráhy je zprostředkována komunikace mezi buňkami na dlouhé vzdálenosti na úrovni buněk a tím spuštění obranných mechanismů už při akumulaci farmaceutika v kořenech.

Peroxid vodíku může rychle procházet buněčnými membránami, jakmile je uvnitř buňky, může reagovat s ionty Fe^{2+} za vzniku hydroxylových radikálů, což může být původ mnoha jeho toxických efektů. Oproti tomuto toxickému efektu má rostlina různé obranné mechanismy na vyloučení peroxidu vodíku, ale pouze do určitého bodu, dokud nedojde k jejich vyčerpání. Studie Park et al (2018) potvrzuje schopnost rostliny vyloučit peroxid vodíku v závislosti na zvyšující se koncentraci stresoru. Stejný efekt můžeme pozorovat při odběru po 336 h, kdys největší pravděpodobností došlo k aktivaci obranných mechanismů a zvýšení schopnosti rostliny vyloučit peroxidu vodíku v závislosti na koncentrační řadě v porovnání s kontrolou. Tento efekt aktivace obranných mechanismů proti peroxidu vodíku po odběru při 336 h můžeme pozorovat jak při expozici jedné foliární koncentraci paracetamolu (5 mM), tak u chronické a akutní zálivky v závislosti na zvyšující se koncentraci paracetamolu. Je zajímavé, že studie Leitão et al. (2021b), porovnávala oxidační účinek v kořenech a listech salátu a společně se studií Christou et al. (2016) detekovali, výraznější účinek farmaceutických sloučenin v listech salátu než v kořenech rostliny, což ukazuje, že ačkoliv jsou kořeny v přímém kontaktu s kontaminantem, oxidační účinek je výraznější poté, co je transportován do horní části rostlin.

7 Závěr

- Osud léčiv je velmi důležitou otázkou pro výzkum životního prostředí, ale i zdraví lidí. Látky detekované v životním prostředí mohou svou biologickou aktivitou představovat značná environmentální rizika pro celý ekosystém včetně zvířat či rostlin.
- Bylo potvrzeno, že paracetamol ovlivňuje sekundární metabolismus rostlin.
- Aplikace paracetamolu ovlivnila všechny sledované charakteristiky ať už sníženým nebo zvýšeným obsahem látek oproti kontrole v závislosti na čase v rámci experimentu od 24 h po 336 h, v celé koncentrační řadě od 5 μ M do 5 mM u rostlin ošetřených aplikováním paracetamolu zálivkou akutní i chronickou, i u rostlin, kde paracetamol byl aplikován foliárně pouze jednou, a to v koncentraci 5 mM.
- Prokázala se hypotéza, že chronická zálivka paracetamolu ovlivňuje více sekundární metabolismus rostlin v porovnání s jednorázovou aplikací testované látky.
- Ve srovnání se zálivkou, došlo u 5 mM postřiku paracetamolem k menší produkci sledovaných skupin sekundárních metabolitů.

8 Literatura

- Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. 2020. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules* DOI: 10.3390/biom10020221.
- Acosta-Motos JR, Ortuño MF, Bernal-Vicente A, Diaz-Vivancos P, Sanchez-Blanco MJ, Hernandez JA. 2017. Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy* DOI: 10.3390/agronomy7010018.
- Alkimin GD, Daniel D, Frankenbach S, Serôdio J, Soares AMVM, Barata C, Nunes B. 2019. Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Science of the Total Environment* **657**: 926-937.
- Alvarez MA. 2014. Plant biotechnology for health: From secondary metabolites to molecular farming. Page *Plant Biotechnology for Health: From Secondary Metabolites to Molecular Farming*.
- Anjum F, Yaseen M, Rasool E, Wahid A, Anjum S. 2003. Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.) on chemical composition and chlorophyll contents. *Pakistan Journal of Agriculture Science* **40 (1-2)**: 45-49.
- Arakawa O, Hori Y, Ogata R. 1985. Relative effectiveness and interaction of ultraviolet-B, red and blue light in anthocyanin synthesis of apple fruit. *Physiologia Plantarum* **64 (3)**: 323-327.
- Bartha B, Huber C, Harpaintner R, Schröder P. 2010. Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: Investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environmental Science and Pollution Research* **17(9)**: 1553-1562.
- Bártíková H, Skálová L, Stuchlíková L, Vokřál I, Vaněk T, Podlipná R. 2015. Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug Metabolism Reviews* DOI: 10.3109/03602532.2015.1076437.
- BENNETT RN, WALLSGROVE RM. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* **127(4)**: 617-633.
- Bigott Y, Chowdhury SP, Pérez S, Montemurro N, Manasfi R, Schröder P. 2021. Effect of the pharmaceuticals diclofenac and lamotrigine on stress responses and stress gene expression in lettuce (*Lactuca sativa*) at environmentally relevant concentrations. *Journal of Hazardous Materials* DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123881.
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B, Kutchan T, Dixon R. 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules This review comes from a themed issue on Physiology and metabolism Edited. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 254-263.
- Brodowska KM. 2017. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research* **7**:108–123.
- Cappiello F, Loffredo MR, Plato C Del, Cammarone S, Casciaro B, Quaglio D, Mangoni ML, Botta B, Ghirga F. 2020. The revaluation of plant-derived terpenes to fight antibiotic-resistant infections. *Antibiotics* DOI: 10.3390/antibiotics9060325.
- Chalker-Scott L, Fuchigami LH. 2018. The role of phenolic compounds in plant stress responses. Page *Low Temperature Stress Physiology in Crops*.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30(3)**: 239 – 264.
- Chen Y, Huang L, Liang X, Dai P, Zhang Y, Li B, Lin X, Sun C. 2020. Enhancement of polyphenolic metabolism as an adaptive response of lettuce (*Lactuca sativa*) roots to aluminum stress. *Environmental Pollution* DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114230.
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal* DOI: 10.1111/tpj.13299.

- Christou A, Antoniou C, Christodoulou C, Hapeshi E, Stavrou I, Michael C, Fatta-Kassinou D, Fotopoulos V. 2016. Stress-related phenomena and detoxification mechanisms induced by common pharmaceuticals in alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. *Science of the Total Environment* **557-558**: 652-664.
- Conte SS, Lloyd AM. 2011. Exploring multiple drug and herbicide resistance in plants—Spotlight on transporter proteins. *Plant science* DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.10.015.
- Crane M, Watts C, Boucard T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.04.010.
- Cuevas-Rodríguez EO, Dia VP, Yousef GG, García-Saucedo PA, López-Medina J, Paredes-López O, Gonzalez De Mejia E, Lila MA. 2010. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58(17)**: 9542-9548.
- Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.007.
- Dakora FD, Phillips DA. 1996. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend antimicrobial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* DOI: 10.1006/pmpp.1996.0035.
- Damania AB, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas A (Syria) eng, Damania AB (ed. ., Valkoun J (ed. ., Qualset CO (ed. ., International Plant Genetic Resources Inst. R (Italy) eng, FAO R (Italy). PP and PD eng, Genetic Resources Action International B (Spain) eng. 1998. Diversity of major cultivated plants domesticated in the Near East. Aleppo (Syria) ICARDA/IPGRI/FAO/UC/GRCP. Pages 51-64.
- Daneshmand F, Arvin MJ, Kalantari KM. 2010. Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum* **32(1)**: 91-101.
- De Abreu IN, Mazzafera P. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry* **43(3)**: 241-248.
- Devireddy AR, Zandalinas SI, Fichman Y, Mittler R. 2021. Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress. *Plant Journal* **105(2)**: 459-476.
- Dong NQ, Lin HX. 2021. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* DOI: 10.1111/jipb.13054.
- Dordio A V., Belo M, Martins Teixeira D, Palace Carvalho AJ, Dias CMB, Picó Y, Pinto AP. 2011. Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresource Technology* **102(17)**: 7287-7234.
- Fischbach RJ, Kossmann B, Panten H, Steinbrecher R, Heller W, Seidlitz HK, Sandermann H, Hertkorn N, Schnitzler JP. 1999. Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant, Cell and Environment* **22(1)**: 27-37.
- Galieni A, Di Mattia C, De Gregorio M, Specca S, Mastrocola D, Pisante M, Stagnari F. 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae* **187**: 93-101.
- García-Rodríguez A, Matamoros V, Fontàs C, Salvadó V. 2014. The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants—a review. *Environmental Science and Pollution Research* DOI: 10.1007/s11356-013-2448-5.
- Glick BR. 2003. Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* **21(5)**: 383-393.

- Gouda AA, Kotb El-Sayed MI, Amin AS, El Sheikh R. 2013. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. *Arabian Journal of Chemistry* DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.12.006.
- Goyal S, Lambert C, Cluzet S, Mérillon JM, Ramawat KG. 2012. Secondary metabolites and plant defence. *Page Plant Defence: Biological Control* 109-138.
- Griffith M, Yaish MWF. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends in plant science* **9(8)**: 399-405.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R, Fujita M. 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. DOI: 10.3390/ijms14059643.
- Hawrylak B, Matraszek R, Szymańska M. 2007. Response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to selenium in nutrient solution contaminated with nickel. *Vegetable Crops Research Bulletin* **67**: 63-70.
- Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A. 2007. Polyphenol Content and Antioxidative Activity in Some Species of Freshly Consumed Salads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:1724–1729. American Chemical Society. Available from <https://doi.org/10.1021/jf0628983>.
- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF. 2012. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular biology reports* **39**: 969-987
- Huber C, Bartha B, Harpaintner R, Schröder P. 2009. Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants-two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental Science and Pollution Research* **16**: 206.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* **54**: 287–293. Taylor & Francis. Available from <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- Janská A, Maršík P, Zelenková S, Ovesná J. 2010. Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant biology* DOI: 10.1111/j.1438-8677.2009.00299.x.
- Jibril SA, Hassan SA, Ishak CF, Megat Wahab PE. 2017. Cadmium Toxicity Affects Phytochemicals and Nutrient Elements Composition of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Advances in Agriculture* DOI: 10.1155/2017/1236830.
- Jones HG, Jones MB. 2010. Introduction: some terminology and common mechanisms. *Page Plants under Stress* DOI: 10.1017/cbo9780511661587.002.
- Kim MJ, Moon Y, Tou JC, Mou B, Waterland NL. 2016. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* DOI: 10.1016/j.jfca.2016.03.004.
- Kolahi M, Mohajel Kazemi E, Yazdi M, Goldson-Barnaby A. 2020. Oxidative stress induced by cadmium in lettuce (*Lactuca sativa* Linn.): Oxidative stress indicators and prediction of their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* **146**: 71-89.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT, Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics* DOI: 10.1016/j.jprot.2011.02.006.
- Koudela M, Petříková K. 2008. Nutrients content and yield in selected cultivars of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. var *crispa*). *Horticultural Science* DOI: 10.17221/3/2008-hortsci.
- Kramer GF, Norman HA, Krizek DT, Mirecki RM. 1991. influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* **30(7)**: 2101-2108.

- Křístková E, Doležalová I, Lebeda A, Vinter V, Novotná A. 2008. E. Křístková et al., 2008; Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. HORT. SCI. DOI:
- Krupa Z, Baranowska M, Orzol D. 1996. Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? *Acta Physiologiae Plantarum* **18(2)**: 147-151.
- Kudrna J, Hnilická F, Kubes J, Vachova P, Hnilickova H, Kuklova M. 2020. Effect of acetaminophen (Apap) on physiological indicators in *Lactuca Sativa*. *Life* **10(11)**: 1-14.
- Kummerová M, Zezulka Š, Babula P, Tríska J. 2016. Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant *Lemna minor*. *Journal of Hazardous Materials* **302**: 351-361.
- Larson RA. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* DOI: 1 0.1016/0031-9422(88)80254-1.
- Lebeda A, Křístková E, Kitner M, Widrlechner MP, Maras M, El-Esawi MA. 2021. Egypt as one of the centers of lettuce domestication: morphological and genetic evidence. *Euphytica* **218**:10. Available from <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02960-3>.
- Lebeda A, Ryder EJ, Grube R, Doležalová I, Křístková E. 2006. Lettuce (asteraceae; *Lactuca* spp.). *Page Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vegetable Crops*. CRC press 377-342.
- Lei XY, Zhu RY, Zhang GY, Dai YR. 2004. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: The possible involvement of polyamines. *Journal of Pineal Research* **36(2)**: 126-131.
- Leitão I, Leclercq CC, Ribeiro DM, Renaut J, Almeida AM, Martins LL, Mourato MP. 2021a. Stress response of lettuce (*Lactuca sativa*) to environmental contamination with selected pharmaceuticals: A proteomic study. *Journal of Proteomics* DOI: 10.1016/j.jprot.2021.104291.
- Leitão I, Martins LL, Carvalho L, Oliveira MC, Marques MM, Mourato MP. 2021b. Acetaminophen induces an antioxidative response in lettuce plants. *Plants* DOI: 10.3390/plants10061152.
- Lephatsi MM, Meyer V, Piater LA, Dubery IA, Tugizimana F. 2021. Plant responses to abiotic stresses and rhizobacterial biostimulants: Metabolomics and epigenetics perspectives. *Metabolites* DOI: 10.3390/metabo11070457.
- Lepš J, Šmilauer P. 2016. *Biostatistika*. Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.
- Liang B, Huang X, Zhang G, Zhang F, Zhou Q. 2006. Effect of lanthanum on plants under supplementary ultraviolet-B radiation: Effect of lanthanum on flavonoid contents in soybean seedlings exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Journal of Rare Earths* **24(5)**: 613-616.
- Llorach R, Martínez-Sánchez A, Tomás-Barberán FA, Gil MI, Ferreres F. 2008. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry* **108(3)**: 1028-1038.
- Mahajan S, Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* DOI: 10.1016/j.abb.2005.10.018.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American journal of clinical nutrition* DOI: 1 0.1093/ajcn/79.5.727.
- Manjasetty BA, Yu XH, Panjekar S, Taguchi G, Chance MR, Liu CJ. 2012. Structural basis for modification of flavonol and naphthol glucoconjugates by *Nicotiana tabacum* malonyltransferase (NtMaT1). *Planta* **236(3)**: 781-793.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables:255–260.
- Marsoni M, De Mattia F, Labra M, Bruno A, Bracale M, Vannini C. 2014. Uptake and effects

- of a mixture of widely used therapeutic drugs in *Eruca sativa* L. and *Zea mays* L. plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **102**: 52-57.
- Martens S, Mithöfer A. 2005. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.07.013.
- Martins LL, Mourato MP, Cardoso AI, Pinto AP, Mota AM, Maria ML, de Varennes A. 2011. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: Effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologiae Plantarum* **33(4)**: 1375-1383.
- Menges M, Dóczy R, Ökrész L, Morandini P, Mizzi L, Soloviev M, Murray JAH, Bögre L. 2008. Comprehensive gene expression atlas for the *Arabidopsis* MAP kinase signalling pathways. *New Phytologist* **179(3)**: 643-662.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: The new wave? *Trend in plant science* DOI: 10.1016/j.tplants.2011.03.007.
- Morison JIL, Lawlor DW. 1999. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell and Environment*. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1999.00443.x.
- Nikzad N, Parastar H. 2021. Evaluation of the effect of organic pollutants exposure on the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using UV–Vis spectrophotometry and chemometrics. *Microchemical Journal* DOI: 10.1016/j.microc.2021.106632.
- Nuruzzaman M, Zhang R, Cao HZ, Luo ZY. 2014. Plant pleiotropic drug resistance transporters: Transport mechanism, gene expression, and function. *Journal of Integrative Plant Biology* DOI: 10.1111/jipb.12196.
- Oh MM, Trick HN, Rajashekar CB. 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology* **166(2)**: 180-191.
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60(3)**: 324-349.
- Park CH, Yeo HJ, Baskar TB, Kim JK, Park SU. 2018. Metabolic profiling and chemical-based antioxidant assays of green and red lettuce (*Lactuca sativa*). *Natural Product Communications* **13(3)**: 315-322.
- PETŘÍKOVÁ K et al. 2006. *Zelenina (pěstování-ekonomika-prodej)*. Profi Press, s.r.o., Praha.
- Pierattini EC, Francini A, Huber C, Sebastiani L, Schröder P. 2018. Poplar and diclofenac pollution: A focus on physiology, oxidative stress and uptake in plant organs. *Science of the Total Environment* **636**: 944-952.
- Podlipná R, Skálová L, Seidlová H, Szotáková B, Kubiček V, Stuchlíková L, Jirásko R, Vaněk T, Vokřál I. 2013. Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology* **144**: 216-224.
- Posmyk MM, Bałabusta M, Wiczorek M, Sliwinska E, Janas KM. 2009. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. *Journal of Pineal Research* **46(2)**: 214-223.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* **269(2)**: 337-341.
- Qu AL, Ding YF, Jiang Q, Zhu C. 2013. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.104.

- Rajabbeigi E, Eichholz I, Beesk N, Ulrichs C, Kroh LW, Rohn S, Huyskens-Keil S. 2013. Interaction of drought stress and UV-B radiation - Impact on biomass production and flavonoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* **86(1)**: 190-197.
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **20(2)**: 101-153.
- Ramakrishna A, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* DOI: 10.4161/psb.6.11.17613.
- Rípodas C, Via VD, Aguilar OM, Zanetti ME, Blanco FA. 2013. Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* **68**: 81-89.
- Rosenkranz M, Chen Y, Zhu P, Vlot AC. 2021. Volatile terpenes – mediators of plant-to-plant communication. *Plant journal* DOI: 10.1111/tpj.15453.
- Ryan E, Galvin K, O'Connor TP, Maguire AR, O'Brien NM. 2007. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods for Human Nutrition* **62(3)**: 85-91.
- San Miguel A, Schröder P, Harpaintner R, Gaude T, Ravanel P, Raveton M. 2013. Response of phase II detoxification enzymes in *Phragmites australis* plants exposed to organochlorines. *Environmental Science and Pollution Research* **20(5)**: 3464-3471.
- Saqib M, Khalid MF, Hussain S, Anjum MA. 2017. Effect of water stress and planting system on growth, yield and quality of sweet potato. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* **16(6)**: 201-210.
- Šarapatka B. UJ a kol. 2007. Ekologické zemědělství v praxi. Svaz ekologických zemědělců PRO-BIO, Šumperk.
- Sarikamiş G, Çakir A. 2017. Influence of salinity on aliphatic and indole glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Applied Ecology and Environmental Research* **15(3)**: 1781-1788.
- Savoi S, Wong DCJ, Arapitsas P, Miculan M, Bucchetti B, Peterlunger E, Fait A, Mattivi F, Castellarin SD. 2016. Transcriptome and metabolite profiling reveals that prolonged drought modulates the phenylpropanoid and terpenoid pathway in white grapes (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology* DOI: 10.1186/s12870-016-0760-1.
- Schröder P, Collins C. 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* **4(4)**: 247-265.
- Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Püttmann W. 2007. Humanpharmakawirkstoffe in der Umwelt: Einträge, Vorkommen und der Versuch einer Bestandsaufnahme. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* DOI: 10.1065/uwsf2007.07.202.
- Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54(25)**: 9329-9339.
- Seigler DS. 1998. Plant Secondary Metabolism. Page Plant Secondary Metabolism.
- Sessa RA, Bennett MH, Lewis MJ, Mansfield JW, Beale MH. 2000. Metabolite Profiling of Sesquiterpene Lactones from *Lactuca* Species. *Journal of Biological Chemistry* **275(35)**: 26877-26884.
- Shamloo M, Babawale EA, Furtado A, Henry RJ, Eck PK, Jones PJH. 2017. Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments. *Scientific Reports* DOI: 10.1038/s41598-017-09681-5.
- Sharma A, Kumar V, Singh R, Thukral AK, Bhardwaj R. 2016. Effect of seed pre-soaking with 24-epibrassinolide on growth and photosynthetic parameters of *Brassica juncea* L.

- in imidacloprid soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **133**: 195-201.
- Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* DOI: 10.3390/molecules24132452.
- Slatnar A, Jakopic J, Stampar F, Veberic R, Jamnik P. 2012. The Effect of Bioactive Compounds on In Vitro and In Vivo Antioxidant Activity of Different Berry Juices. *PLoS ONE* DOI: 10.1371/journal.pone.0047880.
- Steinhorst L, Kudla J. 2013. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant physiology* DOI: 10.1104/pp.113.222950.
- Steudle E. 2000. Water uptake by roots: Effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* **51(350)**: 1531-1542.
- Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science* **161(3)**: 613-619.
- Szakiel A, Pączkowski C, Henry M. 2011. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews* DOI: 10.1007/s11101-010-9177-x.
- Teles YCF, Souza MSR, De Souza M de FV. 2018. Sulphated flavonoids: Biosynthesis, structures, and biological activities. *Molecules* DOI: 10.3390/molecules23020480.
- Ternes TA, Bonerz M, Herrmann N, Teiser B, Andersen HR. 2007. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere* **66(5)**: 894-904.
- Tuteja N, Sopory SK. 2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling and Behavior* DOI: 10.4161/psb.3.8.6186.
- Wan J, Griffiths R, Ying J, McCourt P, Huang Y. 2009. Development of drought-tolerant canola (*Brassica napus* L.) through genetic modulation of ABA-mediated stomatal responses. *Crop science* DOI: 10.2135/cropsci2008.09.0568.
- Wang L, Shan T, Xie B, Ling C, Shao S, Jin P, Zheng Y. 2019. Glycine betaine reduces chilling injury in peach fruit by enhancing phenolic and sugar metabolisms. *Food Chemistry* **272**: 530-538.
- Wei T et al. 2021. Whole-genome resequencing of 445 *Lactuca* accessions reveals the domestication history of cultivated lettuce. *Nature Genetics* **53(5)**: 752-760.
- Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH. 2009. Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition* DOI: 10.1038/ejcn.2009.29.
- Wu X, Dodgen LK, Conkle JL, Gan J. 2015. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review. *Science of the Total Environment* DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.129.
- Xu SL, Rahman A, Baskin TI, Kieber JJ. 2008. Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in arabidopsis. *Plant Cell* **20(11)**: 3065-3079.
- Xu Z, Zhou G, Shimizu H. 2010. Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling and Behavior* DOI: 10.4161/psb.5.6.11398.
- Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules* **23**:1–26.
- Yang T, Ali GS, Yang L, Du L, Reddy ASN, Poovaiah BW. 2010. Calcium/calmodulin-regulated receptor-like kinase CRLK1 interacts with MEKK1 in plants. *Plant Signaling and Behavior* **5(8)**: 991-994.
- Yang X, Flowers RC, Weinberg HS, Singer PC. 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Research* **45(16)**: 5218-5228.

- Yazici I, Türkan I, Sekmen AH, Demiral T. 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environmental and Experimental Botany* **61(1)**: 49-57.
- Ying C, Wan D. 2012. Quantitative determination of total and individual flavonoids in stems and leaves of *Buddleja davidii* and *Buddleja albiflora*. *Pharmacognosy Magazine* **8(32)**: 273-279.
- You Q, Chen F, Wang X, Jiang Y, Lin S. 2012. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *LWT - Food Science and Technology* **46(1)**: 164-168.
- Zhang L et al. 2017. RNA sequencing provides insights into the evolution of lettuce and the regulation of flavonoid biosynthesis. *Nature Communications* DOI: 10.1038/s41467-017-02445-9.
- Zhao X, Carey EE, Young JE, Wang W, Iwamoto T. 2007. Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce. *HortScience* **42(1)**: 71-76.
- Zhong J -j, Seki T, Kinoshita S -i, Yoshida T. 1991. Effect of light irradiation on anthocyanin production by suspended culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnology and Bioengineering* **38(6)**: 653-658.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Rozdělení jednotlivých tříd flavonoidů a jejich chemické struktury.	15
Obrázek 2 - Příklady zástupců dalších fenolických látek.	17
Obrázek 3 - Chemická struktura monoterpenů.	18
Obrázek 4 - Chemické struktury nejhojnějších fytosteroidů.	18
Obrázek 5 - Schéma reakce rostlin na stresové faktory. Převzato od (Leitão et al. 2021b).	19
Obrázek 6 - Různé abiotické stresové signály vytvářející stres v rostlinách. Převzato od (Mahajan & Tuteja 2005).	20
Obrázek 7 - Přehled obranné signalizace u rostlin pod abiotickým stresem. Při vnímaném stresu jsou aktivovány sekundární poslové jako jsou ROS, Ca ²⁺ nebo NO, kteří pak indukují různé kinázy např. mitogen aktivovanou proteinkinázu (MAPK) nebo vápník-závislou proteinkinázu (CDPK). Tohle pak vede k aktivaci transkripčních faktorů (TF), enzymů a proteinů, kteří dále aktivují transkripci genů související s obranou proti stresům. Mimo jiné vznikají i fytohormony, které taky napomáhají k obraně rostlin např. kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) a ethylen (ET). Převzato a upraveno od (Lephatsi et al. 2021).	21
Obrázek 8 - chemická struktura paracetamolu.	28
Obrázek 9 - Extrakce pod Liebigovým zpětným chlazením (vlevo) a filtrace vzorků do odměrných (25 ml) baněk (vpravo). Foto autora (2021).	31
Tabulka 1 - Přehled základních statistických parametrů u salátu hlávkového v letech 2016 až 2021 pro Českou republiku. Zdroj eagri.cz.	11
Tabulka 2 - Podrobný popis makroživin a mikroživin obsažených ve 100 g jedlé části salátu hlávkového. Zdroj Nzip.cz.	12
Graf 1 - Stanovení celkového obsahu flavonoidů po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μM, V3 = 50 μM, V4 = 500 μM, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření ± SD, (F,12 102)=216,02, p=0,0000.	34
Graf 2 - Celkový obsah flavonoidů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD, F (4,20) =131, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 μM, V3=50 μM, V4=500 μM a V5=5 mM.	35
Graf 3 - Stanovení celkového obsahu fenolů po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μM, V3 = 50 μM, V4 = 500 μM, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření ± SD, (F,12 102)=26,452, p=0,0000.	36
Graf 4 - Celkový obsah fenolů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD, F (4,20) =71,30, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 μM, V3=50 μM, V4=500 μM a V5=5 mM.	37
Graf 5 - Stanovení celkového obsahu fenolických kyselin po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 μM, V3 = 50 μM, V4 = 500 μM, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření ± SD, (F,12 102)=187,54, p=0,0000.	37
Graf 6 - Celkový obsah fenolických kyselin po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ±	

SD, F (4,20) =387,54, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 µM, V3=50 µM, V4=500 µM a V5=5 mM.	38
Graf 7 - Stanovení celkového obsahu anthokyaninů po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 µM, V3 = 50 µM, V4 = 500 µM, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření ± SD, (F,12 102)=4,2794, p=0,0000.	39
Graf 8 - Celkový obsah anthokyaninů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD, F (4,20) =31,261, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 µM, V3=50 µM, V4=500 µM a V5=5 mM.	40
Graf 9 - Stanovení antioxidační aktivity po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 µM, V3 = 50 µM, V4 = 500 µM, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření ± SD, (F,12 102)=564,83, p=0,0000.....	41
Graf 10 - Celkový obsah anthokyaninů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD, F (4,20) =850,74, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 µM, V3=50 µM, V4=500 µM a V5=5 mM.	41
Graf 11 - Stanovení vychytávání peroxidu vodíku po aplikaci paracetamolu. V1=kontrola, V2=5 µM, V3 = 50 µM, V4 = 500 µM, V5=5 mM. Oranžově vyznačená chronická zálivka, modře jednorázová. Hodnoty představují průměr 3 měření ± SD. (F,12 102)=58,986, p=0,0000.	42
Graf 12 – HP-FRSA po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD, F (4,20) =68,443, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 µM, V3=50 µM, V4=500 µM a V5=5 mM.	43
Graf 13 - Celkový obsah flavonoidů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD F (5,26)=30,95, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 mM.....	43
Graf 14 - Celkový obsah fenolů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD F (5,26)=33,001, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 mM.....	44
Graf 15 - Celkový obsah fenolických kyselin po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD F (5,26)=30,915, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 mM.	45
Graf 16 - Celkový obsah anthokyaninů po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD F (5,26)=2,7750, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 mM.....	45
Graf 17 – Stanovení antioxidační aktivity po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD F (5,26)=1831,1, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 mM.....	46
Graf 18 – HP-FRSA po aplikaci paracetamolu po 336 hodinách. Pro data uvedená v grafu byla provedena ANOVA s post-hoc Tukey testem, n=3, ± SD F (5,26)=231,3, p=0,00000, kde byly rozdíly mezi skupinami za statisticky významné, když p<0,05. V1=kontrola, V2=5 mM.	47

Graf 19 - Analýza hlavních komponent (PCA). Symboly na PCA grafu (A) ukazují standardizované skóre na ose x a y pro koncentrační řadu od V1 (kontrola) po V5 (mM) včetně chronické a jednorázové zálivky, graf (B) je vyjádřením kontroly (V1) a stresovaného vzorku (V2) v rámci celého experimentu (od 0 h po 336 h). Vektorové souřadnice představují korelace mezi standardizovanými proměnnými (TPC – celkový obsah fenolů, TFC – celkový obsah flavonoidů, PAC – celkový obsah fenolických kyselin, TAC – celkový obsah anthokyaninů, PAP – antioxidační aktivitu a HP-FRSA – aktivitu vychytávání peroxidu).....48

