

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognozie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

KULTURY LÉČIVÝCH ROSTLIN IN VITRO (I)

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Oponent diplomové práce: Mgr. Jan Martin, Ph.D.

Hradec Králové, 2007

Monika Pešlová

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a za použití pouze uvedené literatury.

Monika Pešlová

Děkuji Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a užitečné rady.

OBSAH

1.	ÚVOD	6
2.	CÍL PRÁCE	8
3.	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1.	EXPLANTÁTOVÉ KULTURY	9
3.1.1.	Charakteristika	9
3.1.2.	Rozdělení kultur rostlinných explantátů	9
3.1.3.	Odvození explantátové kultury z rostliny	10
3.1.4.	Využití explantátových kultur	10
3.1.5.	Metodologie explantátových kultur	11
3.1.6.	Výhody explantátových kultur	11
3.1.7.	Kultivační podmínky	11
3.1.8.	Ostatní kultivační faktory	12
3.1.9.	Kultivační média pro explantátové kultury [4]	12
3.1.10.	Růstové regulátory [4]	14
3.2.	FYZIOLOGIE STRESU [7]	18
3.2.1.	Stresové faktory	18
3.2.2.	Průběh stresové reakce	19
3.2.3.	Mechanismy stresových reakcí	19
3.2.4.	Toxické látky v prostředí	20
3.2.5.	Alelopatie	21
3.2.6.	Interakce s býložravými živočichy	21
3.2.7.	Reakce na patogenní organizmy	22
3.3.	OXIDAČNÍ STRES	24
3.3.1.	Tvorba aktivních forem kyslíku	24
3.3.2.	Mechanismy ochrany před oxidačním poškozením	24
3.3.3.	Protistresová úloha aktivních forem kyslíku	25
3.4.	ELICITACE A ELICITORY	29
3.5.	OSTROPESTRĚC MARIÁNSKÝ	32
3.6.	PŘÍPRAVKY SE SILYMARINEM	39

4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1.	TECHNICKÉ ZAŘÍZENÍ.....	41
4.2.	CHEMIKÁLIE	41
4.3.	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	41
4.4.	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA	42
4.5.	KULTIVACE KALUSOVÝCH A SUSPENZNÍCH KULTUR	43
4.6.	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ELICITORU	44
4.7.	ELICITACE KULTUR	45
4.8.	STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOLIGNANŮ.....	46
4.9.	STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM	47
4.10.	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	48
5.	VÝSLEDKY	50
6.	DISKUSE.....	59
7.	ZÁVĚR	63
8.	PŘÍLOHY.....	65
9.	SEZNAM LITERATURY	67

1. ÚVOD

Již na počátku své historie poznali lidé, žijící v těsném styku s přírodou a v přímé závislosti na ní, že některé rostliny pomáhají navracet zdraví, jiné že je naopak mohou ohrožovat. [1]

Písemné doklady o využívání bylin k léčení se dochovaly na lékařských papyrech ze starověkého Egypta, kolem 3 000 let před Kristem. Přibližně ve stejné době byl sepsán takzvaný bylinář na dvoře čínského císaře Šen Non. Z pozdější literatury je také známý herbář krále Šalamouna (10. století před našim letopočtem), který údajně obsahuje popisy tří tisíc bylin. Největší zásluhu o poznání léčivých účinků některých rostlin měli lékaři, zejména Řek Galenos. Mnohými poznatky o léčivých účincích bylin (především orientálního původu) přispěli arabští lékaři. Nejvíce z nich se proslavil Ibn Sina, který žil v letech 980 až 1037 a je právem počítán za největšího učence té doby. V současnosti je znám pod jménem Avicena. Ve středověku prosluly bylinářstvím především kláštery. Významnou osobností byl v 16. století lékař Paracelsus. Jeho zásluhou se zdokonalila výroba léčiv a do popředí zájmu se dostaly domácí evropské byliny. Kromě představitelů starověkého a středověkého lékařství má velkou zásluhu na bylinářství řada dalších přírodovědců, například Mattioli. Z roku 1517 pochází nejstarší český herbář, jehož autorem byl český lékař Jan Černý. Všechny středověké herbáře vycházely ze základních spisů řeckých a římských přírodovědců. Každý spis však přinášel nové druhy rostlin a nové poznatky o jejich léčivých účincích. První lékárna vznikla zřejmě roku 850 n.l. v Bagdadu a tam také byl poprvé vydán skutečný lékopis. Vznik první lékárny v Čechách je spojen se jménem Karla IV., který pozval z Florencie vynikajícího znalce rostlin Angela. Ten založil v Praze rozsáhlou zahradu na pěstování léčivých rostlin. [2]

Pěstování léčivých rostlin má dlouhou tradici. Během doby se samozřejmě měnil jak výběr léčivých rostlin, tak i způsoby jejich využití. Vývoj směřoval od rituálních obřadů, při nichž se pomocí rostlin zaříkávalo a vykuřovalo, přes období, kdy se účinky určovaly podle charakteristického tvaru rostliny nebo jejich částí, k dnešní době, kdy využíváme látek obsažených v rostlinách a schopných ovlivňovat životní pochody v lidském těle. [1]

Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka a požadavky na tyto látky rychle stoupají. Proto kromě zemědělské produkce jsou středem zájmu

jiné alternativní zdroje jako například explantátové kultury. Rychlý rozvoj technik explantátových kultur dosáhl takové úrovně, že je možné seriózně hodnotit jejich biotechnologické aplikace pro výrobu farmaceuticky důležitých rostlinných produktů.

[3]

2. CÍL PRÁCE

Seznámení s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále zjistit vliv oxidačního stresu na kalusovou a suspenzní kulturu *Silybum marianum*. Na základě stanovení obsahu flavonolignanů HPLC metodou v této kultuře zjistit, zda oxidační stres zvyšuje tvorbu těchto obsahových látek.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. EXPLANTÁTOVÉ KULTURY

3.1.1. Charakteristika

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Explantátové kultury rostlin vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Oddělením určité části ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny a umístěním této části rostliny do sterilního prostředí, kde se kultivuje. Vegetativní množení rostlin v explantátových kulturách je možné díky totipotenci rostlinné buňky, což znamená, že i diferencované rostlinné buňky obsahují veškerý genetický materiál potřebný pro regeneraci celé rostliny. [3, 4, 5]

3.1.2. Rozdělení kultur rostlinných explantátů

Kultury rostlinných explantátů lze podle morfologické, resp. anatomické charakteristiky řadit do čtyř kategorií:

1. **Kultura orgánová** – orgánové systémy, orgány resp. jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci.
2. **Kultura tkáňová** resp. k. pletivová – do různého stupně soudržné, morfologicky desorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně (pletiva), pomnožované buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.
3. **Kultura suspenzní** – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
4. **Kultura buněčná** resp. kultura volných buněk – volné jednotlivé a identifikované buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.

5. **Kultura protoplastů** – buňky zbaveny buněčných stěn, kde buněčný obsah je obalen nikoliv pevnou buněčnou stěnou, ale jen pružnou, elastickou plasmolemou. [54]

3.1.3. Odvození explantátové kultury z rostliny

Prvým úkolem je získat stabilní vysokoprodukční explantátové kultury sestávající z jednotlivých buněk nebo jejich několikačetných agregátů. Explantová kultura se získává z kterékoliv části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou živnou půdu a inkubací v teplotním rozmezí 23 až 28°C. Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Obsah růstových látek a vitamínů v živné půdě má rozhodující význam nejen pro růst kalusové kultury, ale i pro převádění kalusu do suspenzní kultury.

3.1.4. Využití explantátových kultur

- jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů
- umožňují též konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin
- získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk, z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny
- produkty biotransformací, kdy z poměrně levných a dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky, protože příslušné enzymy se u mikroorganismů nevyskytují
- ozdravování rostlin a produkce bezvirózního materiálu
- masová produkce geneticky identického materiálu cestou mikropropagace (produkce okrasných druhů rostlin, množení ovocnářsky významných druhů rostlin a zeleniny)
- rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd
- uchování genobanky jednotlivých druhů, kultivarů atd.
- produkce haploidních rostlin jako výchozího materiálu pro šlechtitelské programy

- somatická hybridizace, somaklonální variabilita
- mají své uplatnění také v biochemických, fyziologických, morfologických a genetických studiích. [3, 5]

3.1.5. Metodologie explantátových kultur

V podstatě využívá mikrobiologických technik a biotechnologických procesů založených na mikroorganizmech. Existují však rozdíly mezi kultivacemi mikroorganismů a rostlinných buněk. Kultivace explantátových kultur probíhají delší dobu (buněčný cyklus u explantátových kultur se pohybuje od 15 h výše), jsou citlivější na střížné síly při mechanickém míchání, pro selekci a stabilizaci určitých genotypů se používají komplikovanější postupy a živné půdy jsou dražší. [3]

3.1.6. Výhody explantátových kultur

- lze dlouhodobě a poměrně v malém prostoru kultivovat velké populace buněk, a z každé lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu
- využívané složky mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách nebo půdních podmínkách
- pěstované buňky mohou být zbaveny mikrobů a hmyzu
- buňky jakékoliv rostliny, bez ohledu na její geografický původ, mohou být snadno pěstovány k získání jejich specifických metabolitů
- automatická kontrola buněčného růstu a racionální regulace metabolických procesů může přispět ke snížení pracovních nákladů a zvýšení produktivity. [3, 6]

3.1.7. Kultivační podmínky

Růst a vývoj explantátových kultur umožňují kultivační podmínky:

- kultivační médium - zdroj energie, výživy a regulačních látek
- světelný režim - intenzita a kvalita světla a fotoperioda
- teplota

- vlhkost

Za určitých podmínek mohou být z explantátových kultur dopěstovány nové rostliny (cíl většiny manipulací *in vitro*).

Tento proces je uskutečněn podle následujícího cyklu: rostlina – explantát – kultura *in vitro* - organogeneze nebo embryogeneze – intaktní rostlina. [4]

3.1.8. Ostatní kultivační faktory

Úspěšnost kultivace explantátových kultur je ovlivněna četnými faktory.

Mezi nejdůležitější faktory patří:

- orgán, ze kterého byl izolován explantát
- fyziologické a ontogenetické stádium rostliny
- období odběru explantátu
- velikost explantátu
- zdravotní stav donorové rostliny
- genotyp
- orientace explantátu
- inokulační hustota

3.1.9. Kultivační média pro explantátové kultury [4]

Mezi nejčastěji používaná média patří

- **MS** (podle Murashigeho a Skooga)
- **White**
- **B5** (podle Gamborga)
- **SH** (podle Shenka a Hildebranta)
- **Lloyd-McCown**

Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v explantátových kulturách rostlin.

Média používaná pro kultivaci buněk, pletiv a orgánů obsahují obvykle následující složky:

- makroelementy
- mikroelementy

- sacharidy
- vitamíny
- aminokyseliny
- zpevňující látku
- růstové regulátory

Makroelementy

- dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík, síra

Koncentrace jednotlivých prvků je závislá na rostlinném druhu.

Mikroelementy

- nezbytné - železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden.
- nemusí být nezbytné - kobalt, jód, sodík a chlór

Sacharidy

- zdroj uhlíku a energie – sacharóza

Z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů, schopnost autotrofní výživy je velmi omezena.

Vitamíny

- nejčastěji používané vitamíny - thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol
- ostatní - biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin

Normální rostlina sama syntetizuje vitamíny nezbytné k jejímu růstu a vývoji. Jsou pro rostliny nezbytné jako katalyzátory metabolických procesů a limitující faktor růstu explantátových kultur.

Aminokyseliny

- dodávány ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát), často se používá také L-glutamin, L-asparagin a glycin

Slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku v organické formě nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů.

Látky pro zpevnění média

- nejčastěji používanou látkou pro zpevnění média je agar
- další - syntetické látky Phytigel a gerlit.

3.1.10. Růstové regulátory [4]

Rostlinné hormony jsou přirozené i syntetické regulátory růstu. Přirozené regulátory jsou syntetizovány rostlinou samotnou (fytohormony). Rostlinný hormon je organická sloučenina syntetizovaná v jedné části rostliny a translokovaná do části jiné, kde vyvolává fyziologickou reakci. Přirozené i syntetické růstové regulátory rozlišujeme na regulátory povahy stimulační (stimulátory) a povahy inhibiční (inhibitory).

Růstové látky (stimulátory) lze rozdělit do tří základních skupin:

Auxiny, cytokininy a gibereliny

zábranné látky (inhibitory) - kyselina abscisová

etylen

látky s růstově regulačním působením - brassinosteroidy, kyselina jasmonová, polyaminy, oligosacharidy, turgoriny, benzolinon a další.

☐ auxiny

- stimulují v kultivačním médiu růst kalusu a buněk
- stimulují tvorbu adventivních kořenů na segmentech stonků i u explantátů
- významný prostředek pro vyvolání somatické embryogeneze
- spolu s cytokininy základní složkou médií pro explantátové kultury
- nejčastěji používanými auxiny jsou:

kyselina indolyl-3-octová (IAA) - přirozený

kyselina indolyl-3-máselná (IBA) - syntetický

kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) - syntetický

kyselina α -naftyloctová (NAA) – syntetický

□ cytokininy

- stimulují buněčné dělení a tvorbu axilárních prýtů
- iniciace diferenciací pupenů a kořenů v explantátových kulturách (v interakci s auxinem)
- pro růst explantátové kultury, tvorbu kořenů a prýtů (organogenezi) je důležitý vzájemný poměr stimulantů
 - při vysokém poměru auxinu k cytokininu je stimulována iniciace tvorby kořenů, embryogeneze a iniciace tvorby kalusu
 - je-li tento poměr nízký, dochází k indukci tvorby adventivních a axilárních prýtů
- cytokininy jsou využívány v rostlinných biotechnologiích jako složka kultivačních médií při odvozování a udržování rostlinných explantátových kultur a dále při regeneraci rostlin *in vitro*
- uplatňují se při kultivaci vyvíjejících se somatických embryí a hrají klíčovou úlohu při vytváření apikálního meristému u somatických embryí
- cytokininy používané v kultivačních médiích:

benzylaminopurin (BAP) - syntetický

6-dimethylaminopurin (IPA) - přirozený

furfurylaminopurin (kinetin) - syntetické

zeatin – přirozený

□ gibereliny

- stimulují dlouhivý růst (pouze nadzemních částí rostlin)
- stimulují buněčné dělení (dělení je stimulováno v přechodu z fáze G1 do S a fáze S je obvykle zkrácena)
- pro většinu explantátových kultur nejsou tyto látky nezbytné
- gibereliny používané v kultivačních médiích:

GA3, GA7

□ kyselina abscisová (ABA)

- způsobuje inhibici růstu, navozuje dormanci pupenů a semen
- exogenně aplikovaná ABA působí inhibičně na klíčení semen

- její hladina v semenech se snižuje při výstupu z dormance účinkem nízkých teplot, resp. světla
- ABA je důležitá pro maturaci somatických embryí

☐ etylen

- jediný dosud známý plynný hormon
- stimuluje dozrávání některých plodů
- inhibuje dlouhivý růst a stimuluje růst radiální
- inhibuje růst kořenů

☐ látky s růstově regulačním působením

- nejsou řazeny mezi fytohormony z důvodu jejich výskytu ve vyšších koncentracích než je tomu obvyklé pro hormonální látky
- brassinosteroidy
- významně zvyšují rezistenci rostlin ke stresům
 - polyaminy (PA)
- způsobují v systémech *in vitro* růstovou stimulaci
- dochází k intenzivnímu buněčnému dělení
- PA hrají významnou úlohu v obraně rostlin proti stresům
 - glukosaminové oligosacharidy
- účastní se odezvy rostlin na napadení patogeny
- aktivují syntézu fenylalaninamoniaklyázy (PAL), klíčového enzymu syntézy fenolických obranných látek, fytoalexinů
- aktivují syntézu stresového hormonu etylenu

Organické extrakty

- protein hydrolyzát
- kokosové mléko
- sladový extrakt
- banánový extrakt
- pomerančová a rajčatová šťáva

Jejich použití se však příliš nedoporučuje pro jejich nedefinovatelné složení.

3.2. FYZIOLOGIE STRESU [7]

3.2.1. Stresové faktory

Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory (stresory).

Problematika stresu u rostlin je komplikovanější než ve fyziologii živočichů. Je to dáno nejen přisedlým způsobem života, který neumožňuje únik před působením stresorů, ale také tím, že u rostlin je mnohem větší mezidruhová variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv).

Stresové faktory dělíme na:

Abiotické:

fyzikální

- mechanické účinky větru
- nadměrné záření (UV, viditelné)
- extrémní teploty (horko, chlad, mráz)

chemické

- nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
- nedostatek živin v půdě, nedostatek iontů solí a vodíku v půdě
- toxické plyny ve vzduchu

Biotické:

- herbivorní živočichové (spásání, poranění)
- patogenní mikroorganismy (viry, mikrobi, houby)
- vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus)

Stresové faktory, ať už fyzikálně-chemické či biotické, mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nestejně snadno, a to především v důsledku

různě vyvinutých ochranných struktur. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. tlustá kutikula na listech). Z fyziologického hlediska jsou mnohem zajímavější mechanismy aktivní odolnosti (stress tolerance), omezující negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, který bývá označován jako **stresová reakce**.

3.2.2. Průběh stresové reakce

Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (*poplachová fáze*). Pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů (*restituční fáze*), které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům (*fáze rezistence*). Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem (*fáze vyčerpání*). Průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako **adaptační schopnosti**. Přechodné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru a nazývané jako **aklimace** může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře).

3.2.3. Mechanizmy stresových reakcí

K nejčastějším společným změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresovým faktorům současně patří:

- tvorba stresových proteinů,
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku,
- tvorba „stresových“ fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylenu, kyseliny jasmonové, metyljasmonátu a polyaminů),
- tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek).

3.2.4. Toxické látky v prostředí

Stále vyšší obsah toxických látek v prostředí je spojen hlavně s průmyslovou a zemědělskou činností člověka (spalování toxických paliv, používání umělých hnojiv, pesticidů, detergentů atd.). Tak se dostávají do prostředí i sloučeniny, které se v přírodě nikdy dříve nevyskytovaly (xenobiotika).

Oxid siřičitý

Oxid siřičitý se sice v atmosféře Země vyskytoval i před industriální érou (z vulkanických emisí), ovšem v současné době se jeho koncentrace mnohonásobně zvýšila, hlavně v důsledku spalování uhlí s velkým obsahem síry. Po jeho proniknutí buněčnou stěnou se rychle rozpouští a mění na siřičitanové aniony, jejichž naprostá většina vstupuje do chloroplastů a ve vyšší koncentraci blokuje činnost karboxylačního enzymu Rubisko, a tím je inhibován i průběh sekundárních procesů fotosyntézy. Nejvíce ohroženy bývají druhy s dlouhověkými listy, zejména jehličnaté stromy, a také některé stélkaté rostliny s růstovou aktivitou v zimním období.

Ozon

Naprostá většina ozonu vzniká fotolýzou oxidů dusíku (NO, NO₂) a také některých plynných organických sloučenin (uhlovodíků). K rozkladu těchto látek dochází účinkem ultrafialového záření. Velké koncentrace ozonu se proto vytvářejí v horních vrstvách znečištěného ovzduší vystavených intenzivnímu slunečnímu záření, zvláště je-li inverzní typ počasí s malou turbulentní výměnou. Nejvíce poškozené bývají druhy s intenzivní výměnou plynů v listech. Ozon vstupuje do listů výhradně průduchy a již v intercelulárách v kontaktu s vlhkými buněčnými stěnami se velmi rychle rozkládá. Při rozkladu ozonu vzniká nejen molekulární kyslík, ale jako meziprodukty i vysoce reaktivní superoxid (O²⁻) a hydroxilový radikál (OH[·]). Ty jsou částečně zneškodněny již v buněčné stěně přeměnou na peroxid vodíku a pak na vodu, ale některé pronikají i do buňky, kde jsou postupně deaktivovány. Ozon indukuje tvorbu etylenu, polyaminů a flavonoidů, které jsou také součástí obranných mechanismů. Při vyšších koncentracích ozonu a při jeho delším působení nejsou ochranné antioxidační systémy dostatečné a dochází k poškození buněčných součástí.

Toxické kovy

Zejména zinek, olovo a kadmium, se dostávají do půdy ve větších množstvích usazováním prachu z průmyslových procesů, z výfukových plynů, z kontaminovaných odpadních vod a hnojiv. Ionty těchto kovů jsou velmi snadno přijímány kořeny, neboť selektivita transportních proteinů je zřejmě nedostatečná pro jejich rozlišení od těchto prvků, které jsou pro život rostliny nezbytné. Po vstupu do buněk inaktivují některé enzymy a redoxní systémy. Inhibice dělení a dlouhivého růstu buněk, která se projevuje zejména zpomalením růstu primárního kořene, bývá jedním z prvních příznaků jejich toxického působení. V kořenech také dochází k největšímu hromadění těžkých kovů. Část toxických iontů je přesto translokována i do nadzemních orgánů, kde nejvíce ovlivňuje fyziologické procesy v listech, v první řadě fotosyntézu.

3.2.5. Alelopatie

Každá rostlina obsahuje velké množství sekundárních metabolitů, z nichž některé mohou působit inhibičně až toxicky na jiné rostliny vyskytující se v jejich těsné blízkosti. Pokud dojde skutečně k přenosu účinné látky a k ovlivnění sousední rostliny, pak hovoříme o alelopatii.

3.2.6. Interakce s býložravými živočichy

Rostliny jsou vystaveny stálému nebezpečí poškození svých orgánů mnoha druhy živočichů zejména z početných skupin fytofágního hmyzu, ale i pastvou evolučně vyspělejších býložravců. Kromě mnoha morfologických a morfogenetických adaptací k omezení herbivorie (např. ostré trny či trichomy) jsou také velmi časté rozmanité biochemické adaptace. Z velkého množství sekundárních metabolitů, které se syntetizují v rostlinách, mnohé působí odpudivě až toxicky na herbivorní organizmy. Z hlediska množství, v jakém se vyskytují, lze je rozdělit do dvou kategorií. První z nich zahrnuje látky **kvalitativně významné**, které se sice vyskytují jen v malých koncentracích, ale zato jsou pro živočichy velmi toxické. Patří sem nejruznější alkaloidy, glykozidy uvolňující kyanovodík, glukozinoláty a mnoho dalších. Do druhé kategorie řadíme **kvantitativně významné** metabolity, které sice nejsou tak toxické, ale ve větším množství (často tvoří více jak 10% sušiny!) způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu (např. lignin, taniny a fenolické látky).

3.2.7. Reakce na patogenní organizmy

Na počátku všech obranných reakcí musí být podnět k jejich spuštění, kterým obvykle bývá specifický metabolit (**elicitor**, exogenní elicitory = některé metabolity vylučované patogeny, endogenní elicitory = uvolňují se z porušených buněčných stěn obou organismů) uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské rostliny. Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí **přenašečů signálu** (označovaných také jako druzí poslové). Přenos od aktivovaných receptorů elicitorů (obvykle v plazmatické membráně) k DNA v jádře je možný více systémy, především fosfoinozitudovým systémem, při kterém hydrolýzou lipidů plazmatické membrány jsou generovány dvě signální sloučeniny (inozitol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol), které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkinázy a posléze i expresi genů. Velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je **tvorba superoxidu** a dalších aktivních forem kyslíku vyvolaná elicitory. Zvýšené množství peroxidu vodíku je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Kromě možného přímého účinku peroxidu vodíku na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta, při které nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát a ty pak teprve ovlivňují transkripci.

Vlastní obranné reakce zahrnují jednak tvorbu specifických stresových proteinů, jednak syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem. Mezi sekundární metabolity s ochrannou funkcí patří nejrůznější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, které bývají souhrnně označovány jako **fytoncidy** či **inhibitiny**.

Zvláštní skupinu specifických nízkomolekulárních obranných látek tvoří **fytoalexiny**, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začnou se vytvářet až po napadení patogenem. Je známo více než 300 fytoalexinů. Například isoflavonoidy u rostlin čeledi *Fabaceae*, seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*), stilbeny (*Vitaceae*). Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanikám toxického působení fytoalexinů. Fytoalexiny mají vysoce toxické účinky již v koncentracích 10^{-6} až 10^{-5} mol l^{-1} hlavně na patogenní houby, méně pak na bakterie.

Poměrně častá a překvapivě účinná reakce na průnik patogenů je řízená tvorba ochranných **nekróz**. Jiným typem obranných reakcí rostlin je rychlé zvýšení tvorby polysacharidu **kalózy** (1,3-D-glukan), který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa.

3.3. OXIDAČNÍ STRES

Běžný molekulární kyslík v naší atmosféře je poměrně málo reaktivní, ovšem některými procesy v rostlinách může být přeměněn na mnohem aktivnější formy (singletový kyslík a superoxidový aniont O_2^-) či silně oxidační sloučeniny (hydroxilový radikál OH^\cdot , peroxid vodíku H_2O_2). Úloha těchto látek ve stresovaných rostlinách je značně rozmanitá a do jisté míry rozporná. Jednak vznikají jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů a rostliny musí mít účinné systémy na jejich deaktivaci, jednak mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů, a je tudíž žádoucí jejich koncentraci udržovat na jisté úrovni.

3.3.1. Tvorba aktivních forem kyslíku

V buňkách probíhá několika způsoby. Pomineme-li již dříve zmíněnou interakci buněk s atmosférickým ozonem, pak hlavní zdroje vnitrobuněčné produkce musíme hledat v procesech probíhajících v organelách (chloroplasty, mitochondrie) a v jejich membránách.

3.3.2. Mechanismy ochrany před oxidačním poškozením

Lze rozdělit do několika skupin. Do první patří systémy přímé deaktivace. K těm patří především **karotenoidy**, které velmi rychle odstraňují singletový kyslík z protein-pigmentových komplexů chloroplastu. V membránách se také vyskytuje lipofilní sloučenina **α -tokoferol** (vitamin E), která je schopna deaktivovat singletový kyslík a chránit membránové lipidy před peroxidací. Nejuniverzálnější ochranu před poškozením aktivními formami kyslíku ve všech částech buňky poskytují některé **specializované enzymy** a enzymatické systémy. K těm patří především superoxidodismutáza (SOD), která katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku a ten je dále rozkládán buď katalázou (především v peroxizomech a glyoxyzomech), nebo askorbátperoxidázou (AP) (v chloroplastech někdy i v cytozolu). K reakci katalyzované AP je nutný askorbát a k regeneraci vznikajícího dehydroaskorbátu také glutathion společně s enzymy dehydroaskorbátreduktázou a glutathionreduktázou. Askorbát navíc může reagovat se superoxidem a singletovým kyslíkem i přímo, bez účasti enzymů.

3.3.3. Protistresová úloha aktivních forem kyslíku

Zcela zásadní roli mají nepochybně v hypersenzitivní reakci při napadení rostliny patogenem. Peroxid vodíku je zapojen i do dalších obranných reakcí rostliny při napadení patogeny. V součinnosti s kyselinou salicylovou (která je schopna inaktivovat katalázu, a tím dočasně zvýšit koncentraci peroxidu vodíku) indukuje tvorbu některých stresových proteinů. Funkce peroxidu vodíku jako přenašeče signálu pro expresi některých genů je ostatně dobře známa i u živočichů a bakterií. Regulovaná tvorba aktivních forem kyslíku může mít ovšem i přímý antimikrobiální účinek a může také významně přispívat ke zpevnění buněčné stěny, a tím i k větší odolnosti vůči různým stresovým faktorům. Peroxid vodíku je totiž jednak nezbytným činidlem při tvorbě ligninu z fenylypropanoidních alkoholů, jednak se podílí na vzniku pevných vazeb mezi proteiny v buněčné stěně a na zvýšení jejich nerozpustnosti.

Rostlinné sekundární metabolity jsou jedinečným zdrojem léčivých přípravků, potravinových doplňků, aromat a dalších průmyslových látek. Akumulace takových metabolitů se často děje v rostlinách vystavených stresu (včetně různým elicitorům a signálními molekulám). Porozumění signálními transdukčním drahám včetně elicitem navozené produkce sekundárních látek je důležité pro maximální využití jejich obchodní produkce. [27]

Například polští vědci hodnotili citlivost rajčatové tkáně a spor z nekrotrofické izolace *Botrytis cinerea* na H_2O_2 ; vliv exogenního H_2O_2 a *B. cinerea* na rostlinou tkáň a aktivitu peroxidázy, katalázy a superoxidodismutázy v apoplastické rajčatové listové frakci. Hostitelské buňky byly poškozeny 40 mM H_2O_2 a došlo k inhibici klíčení spor *B. cinerea in vitro*. Úplná inhibice klíčení byla pozorována po použití 100 mM H_2O_2 . V přítomnosti spor byl peroxid vodíku rozložen na H_2O a O^{2-} . V roztoku, který byl použitý pro inokulaci spor se zjistila stopa aktivity katalázy. Po ošetření listů 40 mM H_2O_2 se objevila nekróza, která se podobala hypersenzitivní reakci. Na listech ošetřených touto koncentrací byla pozorována infekce. Pro tkáň škodlivá koncentrace peroxidu vodíku stimulovala aktivitu peroxidázy, měřenou NADH odpovědnou za tvorbu O^{2-} , stejně tak syringaldazinem a ferulovou kyselinou, což jsou charakteristické substráty pro dřevnatění a zpevnění buněčné stěny. V apoplastu byl pozorován jasný růst katalázové aktivity vyplývající z infekce a časného ošetření peroxidem vodíku. Superoxidodismutáza nebyla aktivována. Předpokládá se, že klíčící spory produkují

enzymy, které rozkládají H_2O_2 tvořený v apoplastu, a tak je malá pravděpodobnost schopnosti *B. cinerea* přímo inhibovat reaktivní kyslíkové formy během počáteční fáze infekce. Nekrotické léze se podobají hypersenzitivní reakci způsobené exogenním peroxidem vodíku, stejně tak indukce aktivity apoplastických rostlinných enzymů, zejména peroxidázy spojené se zesílením a dřevnatěním buněčné stěny nebyly dostačujícími faktory k inhibici houbové expanze. [28]

Peroxid vodíku produkovaný nektarovým redoxním cyklem se ukázal jako hlavní faktor přispívající k inhibici mikrobiálního růstu v květním nektaru tabáku, avšak tato překážka může být zdolána květním patogenem *Erwina amylovora*. Superoxidová produkce lokalizovaná blízko nektarového průduchu, pomocí obarvení tetrazolínovou modří, byla inhibována difenyljodidem, ale nebyla inhibována kyanidem ani azidem, což svědčí o tom, že NADPH oxidáza je zdroj superoxidu.

Další hybridizační studie v *in situ* indikovaly expresi NADPH oxidázy v časně fázi květního vývoje, ačkoliv superoxid byl tvořen v pozdější fázi (po desáté fázi). NADPH oxidáza v nektarové žláze je zapletená do posttranslační regulace. [29]

V Iránu se vědci zabývali programovanou buněčnou smrtí známou jako apoptóza, která je doprovázena specifickými morfologickými znaky. Konkrétně použili kyselinu fusarovou (FA) a fusariový mykotoxin k zkoušení buněčné smrti v kořenech šafránu (*Crocus sativus* Linnaeus) použitím několika apoptotických kvantitativních rozborů. Mírné dávky FA (50-100 μ M) indukovaly apoptotické znaky (kondenzace chromatinu, od buňky se odštěpují apoptická tělíska, fragmentace nukleosomální DNA do podobných fragmentů o násobcích 180 bází, únik cytochromu c do cytosolu, tvorba H_2O_2), zatímco vysoké dávky FA (>200 μ M) stimulovaly nekrózu. V přítomnosti serinproteázy, kaspázy-1inhibitor nebo kaspázy-3 inhibitor nebyly apoptotické změny v kořenových buňkách pozorovány. [30]

Naočkování primárních listů papriky (*Capsicum annuum*) avirulentním kmenem *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria indukovalo systematickou získanou odolnost (SAR) v neočkovaných sekundárních listech. SAR odpověď byla doprovázena systematickou expresí ochranných genů, systematickým mikro-oxidativním stresem tvořící H_2O_2 a systematická indukce iontového úniku a deposice kalózy v neočkovaných

sekundárních listech. Některé obranné geny zahrnující chitinázu, osmotin, peroxidázu, thionin byly zřetelně indukovány v systematických listech. Zřejmá systematická akumulace H_2O_2 a silný růst peroxidázové aktivity v paprikových listech hraje roli v buněčné smrti v systematické mikro-hypersensitivní reakci vedoucí k indukci SAR. Ošetření primárních listů difenyljodem, inhibitorem oxidativního stresu podstatně redukovalo indukci některých obranných genů a snížilo aktivaci oxidativního stresu v systematických listech odloučených z místa inokulace a podstatně SAR. Celkově tyto výsledky ukázaly, že indukce některých obranných genů stejně tak rychlý růst oxidativního stresu je nezbytný pro založení SAR v paprikách. [32]

Cílem další studie bylo odhalit přispění aniontového kanálu v obranných reakcích spuštěných elicitorem kryptoginem v tabáku. Kryptogin indukoval rychlý (NO^3^-) eflux, ten byl citlivý na blokátory aniontového kanálu a regulován fosforylací a Ca^{2+} influxem. (NO^3^-) eflux působí proti proudu kryptoginem vyvolaného oxidativního stresu a 40-kD proteinkinázy, jejichž aktivace se zdá být kontrolovaná dobou a intenzitou aniontového efluxu. Mimo to inhibitory (NO^3^-) efluxu zmenšily a zpozdily hypersensitivní buněčnou smrt spuštěnou kryptoginem v tabáku. Toto bylo doprovázeno zpožděním nebo kompletní supresí indukce několika ochranných genů, včetně *hsr203J* genu, jehož exprese silně souvisí s programovanou buněčnou smrtí v rostlinách. Výsledky této studie indikovaly úzkou souvislost aniontových kanálů ve zprostředkování ochranných reakcí a hypersensitivní buněčné smrti. [33]

Etiolované mungbean semenáčky byly převedené do čisté vody k rekonvalescenci po 10 hodinách osmotického stresu v polyethylenglykolovém roztoku (-1,8 MPa) při 25°C ve tmě. Během rekonvalescence se zkoumala rychlost uvolnění ethylenu a stupeň aktivních forem kyslíku včetně superoxidového radikálu a peroxidu vodíku. Rychlost produkce ethylenu a množství aktivních kyslíkových forem dramaticky vzrostly po osmotickém stresu. Inhibitory biosyntézy ethylenu, aminoethoxyvinylglycin nebo aminoxyoctová kyselina mohly redukovat rychlost uvolnění ethylenu, ale neměly významný vliv na obsah O^{2-} a H_2O_2 . Stejně tak inhibitor thiosulfát stříbrný neměl vliv na koncentraci aktivních forem kyslíku (ROS), stres

vyvolaný ethylenem nebyl příčinou k růstu stresu vyvolaného ROS. Vnější původce superoxidového radikálu (methylviologen nebo dithionan sodný) evidentně

mohly zvýšit ethylenovou produkci, která mohla být inhibována exogenními scavengery superoxidového radikálu (Superoxiddismutáza nebo 1,4-diazabicyklo(2,2,2)oktan). [34]

Na univerzitě v Japonsku hodnotili fyziologický potenciál obranného systému proti peroxidaci membránových lipidů způsobené ekologickým stresem u vyšších rostlin, vytvořili transgenní rostliny tabáku vyjádřené glutathionperoxidázovým proteinem (GPX) v cytosolu (TcGPX) nebo chloroplastech (TpGPX). Aktivita peroxidu vodíku v TcGPX a TpGPX rostlinách směřovala k alfa-linolenové kyselině a byla 47,5-75,3 a 32,7-42,1 nmol min⁽⁻¹⁾ mg⁽⁻¹⁾ protein, zatímco u divoce rostoucích rostlin nebyla detekována žádná aktivita. Transgenní rostliny ukázaly rostoucí toleranci k oxidativnímu stresu způsobeného aplikací methylviologenu (50 μM), mírnou světelnou intenzitou [200 μE m⁽⁻²⁾ sec⁽⁻¹⁾], chladem za vysoké světelné intenzity [4°C, 1000 μE m⁽⁻²⁾ sec⁽⁻¹⁾], solí [250 mM NaCl]. Za těchto stresů peroxidace lipidů [produkce malondialdehydu (MDA)] listů TcGPX a TpGPX rostlin byla jasně potlačena v porovnání s divoce rostoucími rostlinami. /Jednotka μE, milimikrostein představuje 6,023 x 10¹⁴ fotonů/.

Mimoto kapacita fotosynthetického a antioxidantního systému u transgenních rostlin zůstala vyšší než u divoce rostoucích rostlin vystavené chladu nebo soli. Tyto výsledky jasně indikovaly, že vysoký stupeň GPX proteinu v rostlinách (tabáku) sloužil k odstranění nenasycených mastných kyselin, peroxid vodíku generovaný v buněčných membránách za stresových podmínek vedoucí k zachování membránové integrity a zvýšení tolerance na oxidativní stres vyvolaný různými stresovými podmínkami. [36]

3.4. ELICITACE A ELICITORY

Problémem *in vitro* kultur je velmi nízká nebo nulová koncentrace požadovaných metabolitů. Jedním z efektivních způsobů jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních je využití metody elicítace. Strategie je založena na faktu, že akumulace většiny sekundárních látek v rostlinách je součástí obranných mechanismů vyvolaných buď patogeny, nebo vlivy prostředí. Jako příklad obranné reakce rostlin založené na produkci sekundárních metabolitů vyvolané elicitory je možné uvést produkci fytoalexinů.

Elicitory jsou sloučeniny biologického původu, které působí jako aktivátory enzymů v pletivech rostlin nebo stimulují syntézu těchto enzymů. [8,5]

Rozlišujeme biotické a abiotické elicitory:

biotické elicitory – kompletní homogenáty inaktivovaných kultur mikroorganismů, a to hub, bakterií, případně jejich frakce

abiotické elicitory – UV záření, ionty těžkých kovů, změny osmotického tlaku, změny pH a další. [6]

Použití abiotických elicitorů je výhodnější pro jejich snadnější dostupnost a často i nižší cenu. V některých případech však nemohou dokonale nahradit biotické elicitory. Například pro zvýšení hladiny peroxidázy v transformované kořenové kultuře *Armoracia lapathifolia* byly použity abiotické elicitory AgNO_3 a CuSO_4 a z biotických elicitorů extrakty z hub *Verticillium* sp., *Monodictis cataneae* a *Aspergillus niger*. Stoprocentní nárůst peroxidázové aktivity byl dosažen však pouze po elicítaci extraktem z *Verticillium* sp. [16]

Houbový elicitor byl také použit k ošetření buněčných kultur *Catharanthus roseus*, kde tvorba idolových alkaloidů následovala po oxidativním stresu a peroxidaci lipidů. U těchto kultur houbový elicitor též aktivoval ochranné enzymy (superoxiddismutázu, katalázu, a peroxidázu) zapojené do H_2O_2 metabolismu a fenylyalaninamoniolyázu. Samotný H_2O_2 mohl napodobovat oxidativní stres a stimulovat produkci idolových alkaloidů a předošetření NADPH podporovalo elicitem vyvolanou biosyntézu alkaloidů. Oxidativní stres a H_2O_2 produkce, proto těsně souvisí s produkcí idolových alkaloidů. [17]

V další tkáni byl studován vliv na akumulaci silymarinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* a pouze kvasnicový extrakt stimuloval produkci silymarinu. Efekt kvasnicového extraktu potencovala kyselina jasmonová. Metyljasmonát silně podporoval akumulaci silymarinu. [18]

Nové syntetické deriváty jasmonátu vykazují velmi silné stimulační účinky na biosyntézu taxuyunnaninu C u buněčných kultur *Taxus chinensis*. Jedním z derivátů, který byl použit je 2-hydroxyethyljasmonát. [19]

Ultrazvuk jako fyzikální elicitor může ve vhodné intenzitě stimulovat biologické pochody a způsobit dokonce výrazné zvýšení produkce sekundárních metabolitů v buněčných kulturách, jako bylo prokázáno například v rostlinách *Panax ginseng* a *Lithospermum erythrorhizon*. [31, 35, 49]

Jako velice výhodná se jevila kombinace elicitace pomocí ultrazvuku či chemického elicitoru metyljasmonátu *in situ* rozpouštědlovou extrakcí na produkci taxolu v suspenzní kultuře *Taxus chinensis*. Bylo dosaženo zvýšení produkce taxolu na 33-35 mg/l, což je přibližně 17 násobné zvětšení produkce oproti kontrole – 1,9 mg/l. [50]

Produkcí taxolu vyvolaly Ce^{4+} ionty v suspenzní kultuře *Taxus cuspidus*. [20]

U kultury *Salvia miltiorrhiza* Ag ionty ve formě $Ag_2S_2O_3$ v koncentracích 15-40 μM zvyšovaly tvorbu diterpenoidů (tanshionin I, tanshionin IIA, cryptotanshionin). Nárůst produkce těchto látek byl dvojnásobný 12. a 22. den působení tohoto elicitoru. [51]

Rtuťnaté ionty stimulují produkci kumarinů v kultuře *Angelica archangelica*. [22]

Biotické elicitory, kyselina salicylová a kyselina jasmínová zase stimulují produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum*. [25, 26]

Zvýšení produkce flavonoidů bylo také pozorováno po aplikaci $NiCl_2$, $CoCl_2$, $CrCl_3$, $CuSO_4$ a $CdCl_2$, $Hg(Cl)_2$. Také v kalusové kultuře *Glycyrrhiza glabra* bylo zaznamenáno zvýšení obsahu glycyrrhizinu a glycyrrhetinu po elicitaci $CrCl_3$ a $Pb(NO_3)_2$. [21]

Dusičnan stříbrný významně zvyšoval uvolňování skopolaminu a akumulaci skopolaminu a hyoscyaminu u *Brugmansia candida*, za tento účinek je pravděpodobně zodpovědný inhibiční efekt $AgNO_3$ na ethylen. $CaCl_2$ neměl žádný efekt na uvolňování nebo akumulaci alkaloidů, $CdCl_2$ pozitivně ovlivňoval uvolňování alkaloidů. [52]

U suspenzní kultury *Sussurea medusa* byl testován vliv glutathionu či AgNO₃ na produkci sekundárních látek. Přídavek glutathionu či AgNO₃ zvýšil produkci jaceosidinu a hispidulinu (z 32,01 na 51,25 mg/l a z 3,11 na 5,13 mg/l). Přidání obou látek současně v koncentracích 0,1 a 1,0 mmol/l dosáhla produkce jaceosidinu a hispidulinu hodnot 84,3 a 7,9mg/l. Požitím obou elicitorů současně bylo dosaženo lepších výsledků v produkci látek než použitím každého elicitoru samostatně. [53]

Eliminací vápníkových iontů z média buněčných kultur *Silybum marianum* (L.) Gaerten vzrostla produkce flavonolignanů. Ošetřením kultur kalciovým ionoforem A23187 nebyla změněna akumulace silymarinu. Specifický Ca²⁺ chelator EGTA zvýšil obsah silymarinu v buňkách o 200% a jeho sekreci 3-4 krát. Anorganický iont La³⁺ stejně tak blokátor vápníkového kanálu verapamil také stimulovaly produkci. Několik činidel známých blokací intracelulárního vápníkového pohybu takových jako červené ruthenium, thapsigargin znatelně zvýšilo akumulaci silymarinu. Hodnocení ukázalo na roli externího a interního vápníkového toku v metabolismu flavonolignanů buněčných kultur *S. marianum*. [47]

3.5. OSTROPESTRĚC MARIÁNSKÝ

Silybum marianum (L.) Gartn., Asteraceae

Lidově: volče, podstřel, podjedové koření, kotlačka, jmelí panny Marie, mariánský bodlák, bodlák, bejlí panny Marie.

Historie

Počátky rostliny jako léčivky se datují z dob antických lékařů a neztratila na své popularitě ani dnes. Dříve se tento atraktivní bodlák jmenoval ostropes a nebo také bodlák mariánský. Teprve v roce 1879 Čelakovský a Jungmann upravili jeho jméno na ostropestřec mariánský. Usoudili, že jeho základní vlastnosti „ostrý“ a „pestrý“ jsou výstižným a nápaditým znakem pro jeho jméno.

V antice byl známý, mnoho se však o něm nedozvíme. Dioskurides uvádí pouze použití jako dávkivý prostředek, Plinius přidává žlučopudný účinek. Do Evropy se pravděpodobně dostal s mnichy a v klášterní léčbě se používal hojně. Hildegarda z Bingenu jej označuje jako „bodlák na bolení“ a doporučuje proti píchání v boku, čímž byly dříve míněny záněty plic a pobříšnice. V 18. století byl už používán i na jaterní choroby. [9]

Výskyt

Domorodou rostlinou je v Severní Africe, Střední Asii, jižní Evropě a jižní Ruské federaci. Zdomácněla v Severní a Jižní Americe, Austrálii, Číně a Střední Evropě. U nás se pěstuje v zahrádkách, někdy roste divoce na návsích, rumištích a kamenitých stráních. [10, 13]

Ve studiích provedených v Aznalcollar area v jižním Španělsku bylo identifikováno několik rostlinných druhů schopných nejen růst na znečištěných půdách, ale také akumulovat vysoké množství polutantů v jejich výhoncích. K experimentu bylo použito Pb [500 mg Pb kg⁻¹] a Zn [130 mg Zn kg⁻¹], expozice trvala 6 týdnů. Po vyhodnocení biomasy rostlin bylo *Silybum marianum* zařazeno do skupiny rostlin více efektivních v odstranění Pb a/nebo Zn z kontaminované půdy. [39]

Popis

Jednoletá nebo dvouletá přezimující bylina s vřetenovitým kořenem a s přímou větvenou lodyhou, dorůstající výšky až 2 m. Listy jsou střídavé, v obrysu podlouhle eliptické, lesklé, bělavě skvrnitě, na okraji ostnitě zubaté. Velké úbory vyrůstají jednotlivě na dlouhých stopkách. Mají kulovitý zákrov a střeovitě uspořádané, ostnitě zubaté listeny. Květy jsou oboupohlavné, nachové, zřídka bledě fialové nebo bílé. Rostlina kvete od července do září. Plody jsou šedohnědé lesklé nažky s chmýrem. Plod uzavírá velké světlé semeno bez endospermu, jehož tenké osemení je srostlé s oplodím. Rostlina je nepříjemně ostnitá. [11, 12]

Užívaná část

K léčebným účelům se sklízají plody – nažky, zbavené chmýru (*Silybi mariani fructus*).

Nesprávně je za drogu označované semeno. [11, 12]

Silybi mariani fructus je monografií v Českém lékopisu 2005.

Lidově se užívá i list (*Folium cardui mariae*), zřídka kořen (*Radix cardui mariae*).

Mladé výhonky a listy jsou jedlé, v arabských zemích považované za pochoutku. Kořeny lze vařit jako pastinák, zákrovy květenství stejně jako artyčoky. Stonky lze oloupat a vařit jako zeleninu. Semenáčky se konzumují syrové v salátech. [9]

Sběr a úprava

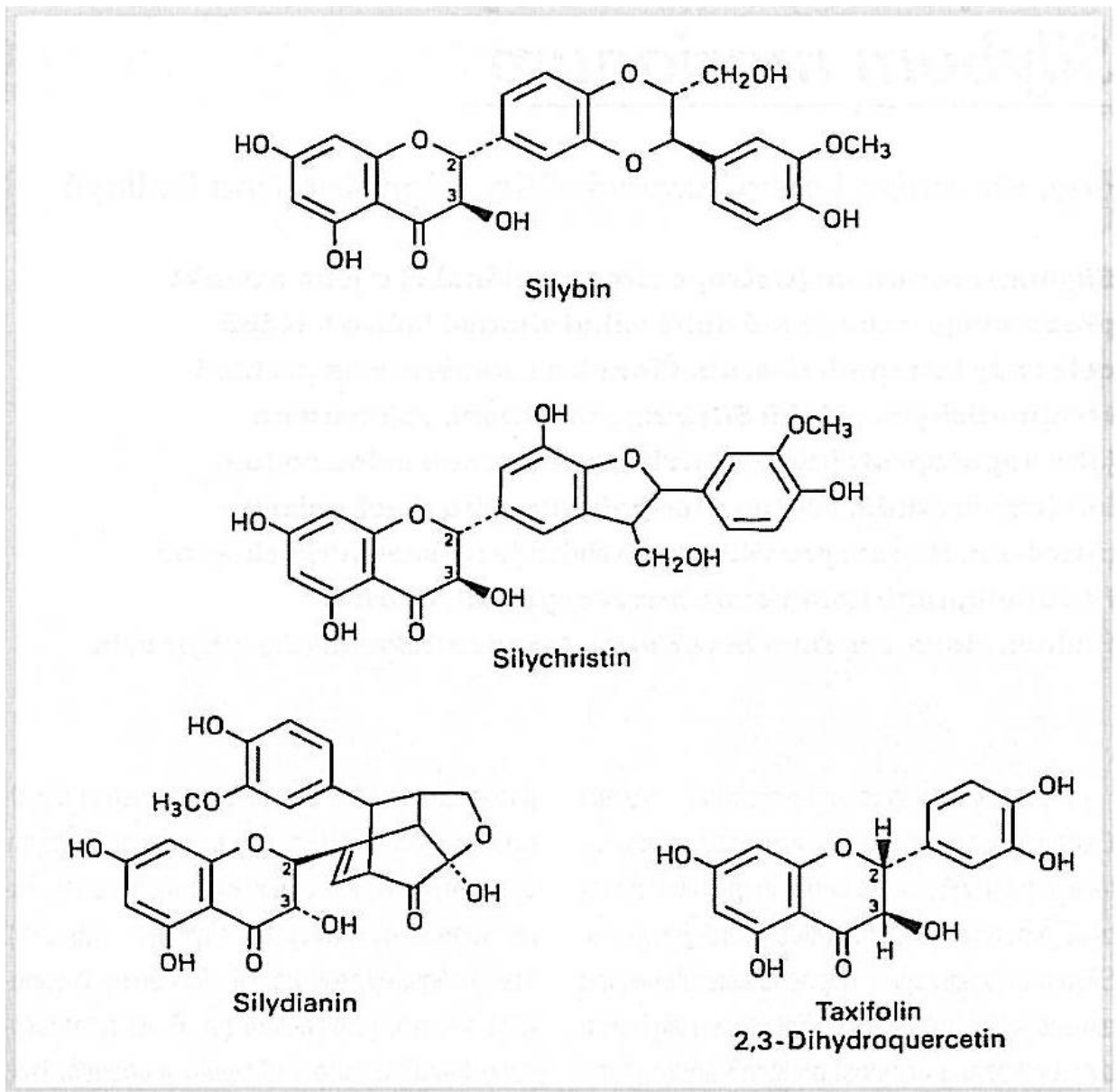
Ostropestřec se sklízí v době, kdy dozrávají úbory na hlavních lodyhách, což bývá ke konci srpna. Sklizeň porostu se provádí sklízecí mlátičkou, zpravidla po předchozí desikaci (umělém vysušení) porostu. Po výmlatu se plody vyčistí, dosuší a zbaví chmýru. Droga má šedohnědou barvu, je bez pachu a chutná nahořkle. Skladuje se v suchu, je třeba ji zabezpečit proti škůdcům. [11]

Obsahové látky

Nažky obsahují především flavonolignany označované jako silymarin (silybinin, silydianin a silychristin), flavonoidy (taxifolin, kvercetin, kemferol), olej s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin (20-30%; kyseliny linolová, olejová, palmitová), aminokyseliny se značným podílem zástupců obsahujících síru, cukry (glukóza, fruktóza a blíže neurčená pentóza), hořčiny, silice, tokoferol (0,6%), steroly (kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol). Pro obsah biogenních aminů (tyramin,

histamin) se droga kdysi doporučovala jako náhražka za námel (*Secale cornutum*), jeho účinnosti však nemohla dosáhnout. Účinné látky jsou bezprostředně pod osemením (tyramin, histamin, silybin), a proto se používá semeno i se slupkou. [11, 12]

Obrázek č. 1 Hlavní obsahové látky *Silybum marianum*



Flavonolignany

V roce 1968 našel Wagner v plodech *Silybum marianum* skupinu flavonoidních sloučenin. Byl jim dán název silymarin. Další studie ukázaly, že silymarin se skládá ze tří izomerických sloučenin – silybinin (silybin), silydianin a silychristin (molekulový vzorec $C_{25}H_{22}O_{10}$). Izomerický poměr silybinu k izosilybinu, silychristinu a k silydianinu je 3:1:1:1. Hlavními obsahovými látkami *Silybum marianum* je tedy skupina flavonolignanů komplexně nazývaná silymarin (1,5-3%). Flavonolignany jsou adiční sloučeniny flavanolů s koniferylalkoholem. Další flavonolignany identifikované v *Silybum marianum* jsou 2,3-dehydrosilybin; 2,3-dehydrosilychristin.

Silymarin a jedna z jeho strukturálních komponent silybinin jsou substance s doloženými hepatoprotektivními vlastnostmi. Jejich mechanismus účinku je nicméně málo jasný. Údaje v literatuře naznačují, že silymarin a silybinin působí čtyřmi různými cestami:

- a) jako antioxidanty, zhášecí a regulátory intracelulárního obsahu glutathionu
- b) jako stabilizátor buněčné membrány a regulátor permeability, který zabraňuje hepatotoxickému agens vstupovat do hepatocytu
- c) jako promotor rRNA syntézy, stimuluje jaterní regulaci
- d) jako inhibitor přeměny hvězdicovitých hepatocytů na myofibroblasty – tj. proces odpovědný za depozici kolagenových vláken, což vede k cirhóze.

Klíčovým mechanismem, zajišťujícím hepatoprotekci se jeví zhášení volných radikálů. [12]

Na Slovensku byly testovány antioxidační vlastnosti silymarinu a jeho flavonolignanových složek (silybin, silychristin a silydianin). Silymarin, silychristin a silydianin vykazovaly relativně dobré antioxidační účinky proti radikálům fenyglyoxylového ketylů a DPPH. Nejvíce efektivními zhášecí radikálů fenyglyoxylového ketylů byly silymarin a silychristin, zatímco silydianin byl 5 krát méně aktivní než první dvě složky, kdežto silybin byl neúčinný. Zhášecí vlastnosti studovaných složek proti DPPH radikálům byly ve stejném pořadí silymarin > silychristin > silydianin > silybin. [37]

Účinky a užití

Plod ostropestřce mariánského Fructus Cardui mariae je důležitou drogou s hepatoprotektivními účinky. Jeho hepatoprotektivní působení je potvrzeno celou

řadou klinických studií. Proto je využíván k léčbě akutních a chronických zánětů jater a cirhóze indukované alkoholem, léky nebo jedy. Silymarin vykazuje i hypocholesterolemickou aktivitu s LDL oxidačním účinkem a u silybininu byla prokázána účinnost při léčbě androgenně dependentní rakoviny prostaty. Silymarin je schopný u zvířat neutralizovat hepatotoxicitu několika agens včetně *Amanita phalloides*, ethanolu, paracetamolu, tetrachlormetanu. Komplex obsahových látek zvyšuje vylučování žluči a uvolňuje křeče. [11, 12, 13]

Silybin a silymarin se ve většině případů používají jako hepatoprotektiva, ale ukázalo se, že mají další zajímavé aktivity např. antikarcinogenní a kanceroprotektivní a také hypocholesterolemickou. Tyto aktivity byly prokázány u mnoha onemocnění rozdílných orgánů např. prostaty, plic, CNS, ledvin, pankreatu a také kůže. Navíc byla objevena cytoprotektivní aktivita silybinu zprostředkovaná jeho antioxidantními vlastnostmi a schopností zhaset volné radikály a nové funkce založené na specifické receptorové interakci. Proapoptotická aktivita silybinu v pre- a/nebo kancerogenních buňkách a antiangiogenní aktivita silybinu jsou další významné účinky, a to přináší možnost aplikovat silymarínové preparáty v onkogení léčbě. Objev inhibice a modulace lékových transportérů, P-glykoproteinů, estrogeních receptorů, jaderných receptorů silybinem a některými jeho novými deriváty přispívají k lepšímu porozumění aktivitu silybinu na molekulární úrovni. Byla také posuzována aplikace silymarinu ve veterinární medicíně. Poslední práce používají opticky čisté diastereoizomery a jasně ukazují extrémní vliv užití opticky aktivního silybinu, a to v receptorových studiích. Významnost silymarinu a jeho složek v medicíně jasně vyplývá z narůstajícího počtu publikací – přes 800 v posledních 5 letech. [40]

Silybinin prokázal antineoplastickou aktivitu na několika *in vitro* a *in vivo* nádorových modelech, včetně nádoru prostaty. Silybin-fytosom je komerčně hodnotnou formulací obsahující silybinin. Tento experiment byl navrhnout k posouzení toxicity vysokých dávek silybin-fytosomu. Silybin-fytosom byl podán orálně pacientům s rakovinou prostaty; 2,5-20 g denně ve třech dávkách. Každá kúra trvala 4 týdny. Třináct pacientů dostalo celkem 91 kúr. Základní pacientovy charakteristiky: průměrný věk 70 let, střední hodnota prostatic specifického antigenu (PSA) z 4,3 ng/ml. K nejvíce výrazným nepříjemným účinkům patřila hyperbilirubinemie se stupněm 1-2 bilirubínové elevace u 9 ze 13 pacientů. Pozorovaný byl pouze třetí stupeň toxicity

elevace alaninaminotransferazy (ALT) u jednoho pacienta. Čtvrtý stupeň toxicity nebyl registrován. Nebyly pozorovány objektivní PSA odpovědi. Vědci v USA vyvodili, že 13 g orálně užitého silybin-fytosomu denně ve třech dávkách se jeví jako dobře tolerovaný u pacientů s rozvinutou rakovinou prostaty. Nejvíce běžným nežádoucím účinkem je asymptomatická jaterní toxicita. [41]

Silymarin byl prvně oceněn pro jeho protektivní efekt proti UV záření způsobující apoptózu maligních melanomových buněk (A375-S2 buňky) u člověka. Ošetření silymarinem 500 mg po 12 hod se projevuje inhibicí UV záření způsobující apoptózu v A375-S2 buňkách. Aktivita kaspázy-9 a kaspázy-3 u UV ozářených buněk A375-S2 byla efektivně redukována silymarinem závislého na způsobu dávkování, zatímco simultánně vzrostla exprese inhibitoru kaspázou aktivované DNázy (ICAD), proteinu Bcl-x(L) a aktivita extracelulárního signálu regulované kinázy/mitogenem aktivované proteinkinázy (ERK/MAPK). [46]

V další studii byly zkoumány účinky silymarinu na glykemický profil u diabetických pacientů. Do 4-měsíční randomizované dvojité slepé klinické studie bylo zapojeno 51 pacientů s diabetem II typu ve dvou vhodných skupinách. První skupina pacientů (n = 25) dostávala silymarin (200 mg) tablety 3 krát denně plus obvyklou léčbu. Druhá skupina (n = 26) podstoupila stejnou léčbu, ale užívala placebo tablety namísto silymarinu. Pacienti navštěvovali lékaře každý měsíc a na začátku a na konci terapie jim byly stanoveny hodnoty: glykovaného hemoglobinu (HbA(1)c), glykémie (FBS), inzulínu, celkového cholesterolu, LDL a HDL, triglyceridů. Výsledky ukázaly významný pokles hodnot HbA(1)c, FBS, celkového cholesterolu, LDL, triglyceridů u pacientů, kteří užívali silymarin v porovnání s placebo užívací skupinou a stejně tak s hodnotami na začátku studie v každé skupině. Na závěr, silymarin užívaný u pacientů s diabetem II typu po dobu 4 měsíců měl prospěšný účinek na zlepšení glykemického profilu. [42]

Izomer (-)-isosilandrin izolovaný z bílé kvetoucí varianty *Silybum marianum* L. pěstovaný v Maďarsku ukázal silnou inhibiční aktivitu na superoxidový aniont (O_2^-) uvolněný z polymorfonukleárních leukocytů (PMNL) než (+)-silybin. [43]

Další studie se soustředila na účinky silymarin-fosfolipidového komplexu redukující toxické účinky aflatoxinu B-1 u kuřat brojlerů. Nakonec výsledky svědčily o tom, že silymarinový fytosom může poskytnout ochranu proti negativním účinkům aflatoxinu B-1 na výkonnost kuřat. [44]

Po krátkodobé léčbě silymarinem byly studovány mozkové aminy a metabolity. Myši byly intraperitoneálně ošetřeny 0, 10, 50 nebo 250 mg/kg silymarinu denně po dobu pěti dnů. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s elektrochemickou detekcí byly určeny koncentrace norepinefrinu (NE), dopaminu (DA), dioxyfenyloctové kyseliny (DOPAC), homovanilové kyseliny (HVA), serotoninu (5-HT), a 5-hydroxyindolactové kyseliny (5-HIAA) v oddělených mozkových oblastech. Analýza prokázala zvýšení 5-HT v kůře a zvýšení DA a NE v mozečku u vysoko dávkovaných skupin. Výsledky ukazovaly na nedostatek nepříznivých účinků na metabolismus mozkových aminů a svědčily o tom, že má silymarin okrajový serotoninergní, dopaminergní a noradrenalinergní efekt. [45]

3.6. PŘÍPRAVKY SE SILYMARINEM

Mezi hromadně vyráběné léčivé přípravky obsahující silymarin patří:

Flavobion – v 1 potahované tabletě 70 mg silymarinum, je jediným volně prodejným HVLP

Lagosa – v 1 dražé 150 mg silymarinum

Legalon – v 1 tobolce 140 mg nebo 70 mg silymarinum

Silygal – v 1 potahované tabletě 70 mg silymarinum

Silymarin AL 50 – v 1 dražé 50 mg silymarinum

Simepar – v 1 tobolce 70 mg silymarinum + vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, pyridoxin, cyanocobalamin, nicotinamid, kalcium panthotenicum) [14]

Sušenou drogu nalezneme v těchto čajových směsích:

Silybum marianum (Silybi mariani fructus) – Herbex v nálevových sáčcích

Játra žlučník – Teekanne v nálevových sáčcích

Plod ostropestřce mariánského – Leros sypaný

Potravními doplňky jsou např.:

Silymax (Nature's Bounty) – 175 mg /standardizovaný extrakt obsahující 80% silymarinu/

Silymarin forte (NaturProdukt) – 100 mg /standardizovaný extrakt na 70-80% silymarinového komplexu/

Silymarin jakon (NaturProdukt) – 100 mg /standardizovaný extrakt na 80% silybininu/ + 300 mg mikronizovaného sušeného prášku z hlíz jakonu (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae)

Ostropestřec (Natrodale) – 250 mg /extrakt ze semen *Silybum marianum* 75:1/ + lecitin, vitamín B₁, B₂, B₆, vitamin E, beta-karoten

Denoxinal (Walmart) – 50 mg /obsahující silybin 42 mg/ + chlorella, lopuch větší, řešetlák, smetanka lékařská, jetel luční, česnek, pektin, vitamín C

Doporučené denní dávkování silymarinu je 210 až 450 mg (jako silymarinového komplexu v extraktu ze semen *Silybum marianum*) ve třech dávkách vždy po jídle.

U dětí do 5 let, těhotných žen a kojících matek se podávání nedoporučuje. U dětí starších 5 let se podává 5-6 mg/kg tělesné hmotnosti/den. [15]

Po perorálním podání silymarinu se nalézají v krvi jen nízké koncentrace jeho hlavní komponenty silybininu, ve žluči se však nalézá asi 20-40% aplikované látky. Jeho renální vylučování je nepatrné, za 24 hodin po aplikaci se objeví v moči jen asi 1-7% aplikované látky. Silybinin se vylučuje převážnou měrou žlučí, a to především v konjugované formě. Lze předpokládat, že se silybin po konjugaci neabsorbuje a dochází tak enterohepatálnímu oběhu. Poločas biliární eliminace je asi 3-4 hodiny. Silybinin se nekumuluje. Při opakovaném podání silymarinu 140mg 3x denně se dosáhne ustáleného stavu biliární eliminace. Silybin je vylučován ledvinami a jeho aktivní metabolity (hlavně sulfátové a glukuronidové konjugáty) jsou nacházeny i ve žluči. Exkrece perorálně podaného silybininu trvá zhruba 24 hod. [12]

Údaje o bezpečnosti silymarinu za léta 1980-1996 naznačují, že výskyt nežádoucích účinků (ze strany gastrointestinálního traktu – nausea 0,13%, diarrhoe 0,2%, dále bolesti hlavy 0,1%, pruritus 0,2% pacientů v klinických studiích) je minimální a není jisté, zda skutečně souvisely s podáváním silymarinu. V literatuře nejsou uváděny žádné vedlejší účinky či klinicky relevantní interakce. Pouze *in vitro*, ve vysokých koncentracích, které prakticky nelze dosáhnout *in vivo*, byl popsán inhibiční účinek silybininu na isoformy cytochromu P-450. [15]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. TECHNICKÉ ZAŘÍZENÍ

- Laboratorní analytické váhy Sartorius PRLT A 1
- Chromatograf JASCO (PAD detektor MD-2015, pumpa PU-2089, autosampler AS-2055)
- Kolona LiChrospher RP 250x4 (5 μ m)
- Autokláv P S 20 A, Chirana SVS 9/1
- Box s laminárním prouděním FATRAN LF
- Třepačka UNIMAX 2010, Heidolph Instruments
- Vakuová odparka LABORATA 4010, Heidolph Instruments

4.2. CHEMIKÁLIE

- Destilovaná voda R
- Metanol R
- Metanolický roztok kyseliny o-fosforečné (0,15% w/v)
- Vodný roztok kyseliny o-fosforečné (0,15%w/v)
- Peroxid vodíku R
- Silymarin p.a., Sigma - Aldrich
- Taxifolin p.a., Simgal - Aldrich

4.3. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- Nově založená kalusová kultura v 10.-24. pasáži, Botanická zahrada léčivých rostlin FaF UK HK, ČR.

4.4. PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA

Pro kultivaci bylo použito médium (MS) připravené dle Murashigeho a Skooga s obsahem kyseliny α -naftyloctové v množství 10 mg na litr kultivačního média jako růstový stimulant. [57]

Složení:

	mg/l		mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00	KNO ₃	1900,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00	NH ₄ NO ₃	1650,00
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,00	FeSO ₄	27,84
Na ₂ EDTA	37,31	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50	H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,830	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,025	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Inozitol	100,00	Hydrolyzát kaseinu	1000,0
Glycin	2,00	Kyselina nikotinová	0,50
Pyridoxin	0,50	Thiamin	0,10
Sacharóza	30000,00		

Množství uvedených substancí je vyjádřeno v miligramech na litr živné půdy. Substance byly odváženy na analytických vahách, látky používané v malých množstvích se pipetovaly z koncentrovaných zásobních roztoků. Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě v odměrné baňce na 1000,0 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku.

4.5. KULTIVACE KALUSOVÝCH A SUSPENZNÍCH KULTUR

Kultivace kalusových kultur probíhala v 100ml Erlenmayerových baňkách, omytých ve vodě se saponátem, vypláchnutých pitnou vodou, destilovanou vodou a usušených v horkovzdušném sterilizátoru při 200 °C. Do baňky byl vložen můstek z filtračního papíru a nalito 30 ml kultivačního média. Takto naplněné baňky byly uzavřeny hliníkovou folií, a pak sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121°C. Tyto baňky byly použity pro pasážování explantátových kultur.

Pasážování (přenášení) podstoupily kultury 30. den kultivace v boxu s laminárním prouděním vzduchu, který byl předem vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vysvícen germicidní UV lampou. Stejně tak byly omyty roztokem Ajatinu uzávěry z hliníkové folie na baňkách. Přenášení se provádělo pomocí sterilních pinzet. Kalusové kultury byly kultivovány 3-4 týdny při teplotě 25°C a osvětlení s 16 hodinovou periodou.

Suspenzní kultura byla odvozena mechanickým rozdrobněním kalusové kultury a kultivována 2 týdny na laboratorní třepačce (120 ot/min) za stejných podmínek jako kalusová kultura.

4.6. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ELICITORU

K elicitaci jsem použila peroxid vodíku (H_2O_2).

Příprava koncentrace c_1 (10 mol/l):

Navážka (2,8332g) 3% roztoku peroxidu vodíku byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna sterilní destilovanou vodou po rysku. Poté byl elicitor sterilizován v autoklávu 15 minut při 121°C .

Příprava koncentrace c_2 (1 mol/l):

Odpipetováním 10 ml roztoku c_1 do odměrné baňky na 100ml a doplněním sterilní destilovanou vodou.

Příprava koncentrace c_3 (0,1 mol/l):

Odpipetováním 10 ml roztoku c_2 do odměrné baňky na 100 ml a doplněním sterilní destilovanou vodou.

Příprava elicitorů o žádané koncentraci probíhala za aseptických podmínek v laminárním boxu a bylo použito sterilní sklo a nástroje.

4.7. ELICITACE KULTUR

Elicitace byla opět prováděna za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu za použití sterilních pipet.

K elicitaci bylo použito vždy 40 baněk pro každou koncentraci elicitoru. Do 30 baněk byl přidán 1ml roztoku elicitoru dané koncentrace a 10 baněk bylo použito jako kontrola. [8]

Kalusy byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách působení elicitoru. Kontrolní kalusy se odebíraly po 24 a 168 hodinách. V rámci každého časového intervalu působení elicitoru včetně kontrol bylo použito k odběru 5 baněk.

U suspenzních kultur byl použit stejný postup za totožných podmínek.

Kalusy po odběru byly usušeny na filtračním papíře za laboratorní teploty. Suspenzní kultury byly přefiltrovány a zachycené shluky na filtračním papíře byly usušeny stejně jako kalusy.

Usušený materiál byl upráškován ve třence s těrkou a použit ke stanovení obsahu flavonolignanů.

4.8. STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOLIGNANŮ

Princip:

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda, kterou lze oddělit analyzované složky ze směsi a zároveň provést jejich kvalitativní a kvantitativní hodnocení s vysokou selektivitou, citlivostí a v relativně krátké době. K dělení látek dochází mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku.

Postup stanovení:

Podmínky HPLC analýzy byly převzaty z rigorózní práce K. Gallové. [55]

Ke stanovení byla použita kolona LiChrospher RP- 18 250x4 (5 µm). Jako mobilní fáze byl použit methanolický roztok kyseliny o-fosforečné (0,15% w/v) (fáze A) a vodný roztok kyseliny o-fosforečné (0,15% w/v) (fáze B).

Eluční profil: v čas 0 – 5 minut, 100% B do 50% A v B (v/v) (lineárně gradientová eluce);

v čase 5 – 25 min, 50% A v B (v/v) (izokratická eluce)

Průtok byl 1,4 ml/min.

Po upráškování byly vzorky v množství 0,1 g extrahovány 2x 10 ml methanolu po dobu 10 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po zfiltrování přes 0,45 µm mikrofiltr následovalo převedení do vialek a nástřik (20 µm) na HPLC. Živná média byla extrahována stejným způsobem a navíc zahuštěna na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v methanolu a doplněn na objem 5 ml, stejně zfiltrován a převeden do vialek. Vzorky byly detekovány při vlnové délce 288 nm. Identifikace obsahových látek byla provedena porovnáním retenčních časů a spekter příslušných píků vzorků se standardem silymarinu a taxifolinu.

Byla provedena vždy tři paralelní stanovení a z těchto hodnot byl vypočítán aritmetický průměr.

4.9. STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM

Do tří předem vysušených váženek se na analytických vahách odvážilo přesně 2,000 g vzorku a sušilo se 2 hodiny v sušárně při 100 až 105 °C. Vysušené vzorky ve váženkách byly uchovány v exsikátoru do vychladnutí, a poté byly zváženy na analytických vahách. Hmotnost sušiny byla vztažena na hmotnost vzorku a vyjádřena v procentech.

Byl vypočítán aritmetický průměr těchto tří měření. [54]

4.10. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

K určení statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonolignanů byl použit t-test rozdílu dvou průměrů.

Vztah testovacího kritéria je:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

t = testovací kritérium

x_1 = aritmetický průměr kontrolního souboru

x_2 = aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 = směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 = směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 = počet členů kontrolního souboru

n_2 = počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočteným podle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočtený stupeň volnosti v a zvolenou hladinu významnosti p. Je-li hodnota t větší než hodnota $t(v)_p$, je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti p. [48]

Ke zjištění obsahu flavonolignanů byla vždy provedena tři paralelní stanovení, proto počet členů souborů je $n_1 = n_2 = 3$, počet stupňů volnosti $v = 4$. Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a pro čtyři stupně volnosti je kritická hodnota testovacího kritéria $t(v)_p = 2,78$.

Výsledky jsou statisticky významné, je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota.

Pro výpočet hodnot testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách byla použita kontrolní hodnota odběru po 24 hodinách a pro odběr po 168 hodinách byla použita kontrola odebraná po 168 hodinách.

5. VÝSLEDKY

Tabulka č. 1- Obsah silychristinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.)

Gaertn.

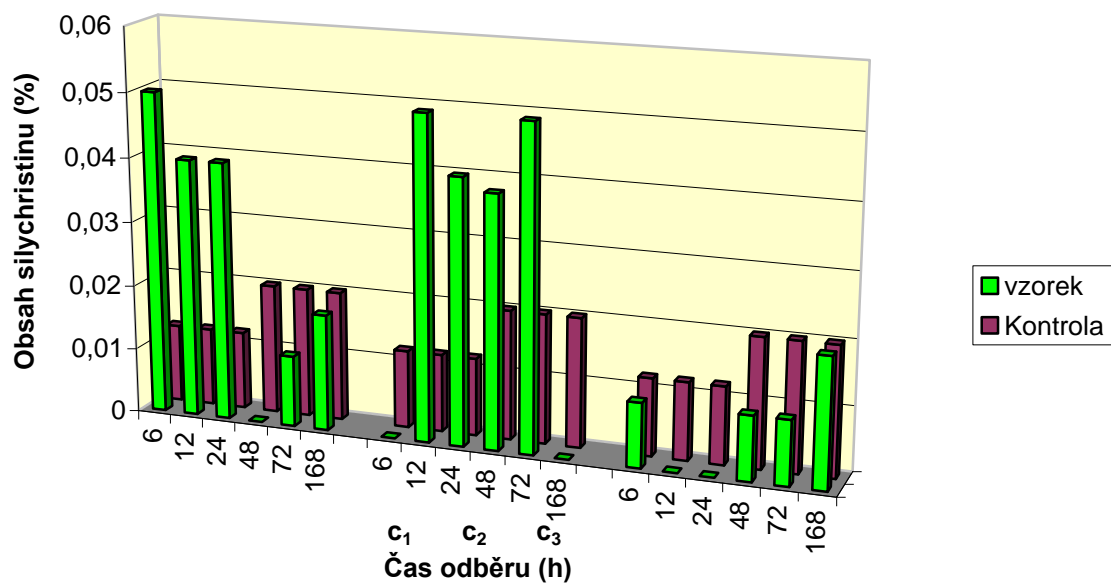
Elicitor: peroxid vodíku

Koncentrace elicitoru (mol/l)	Hodina odběru	Obsah silychristinu (%)	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C ₁ = 10,0	6	0,050	0,002	24,03
	12	0,040	0,005	7,77
	24	0,040	0,003	12,52
	24K	0,012	0,001	-
	48	N	N	N
	72	0,011	0,003	3,53
	168	0,018	0,005	0,53
	168K	0,020	0,002	-
C ₂ = 1,0	6	N	N	N
	12	0,050	0,004	13,03
	24	0,041	0,004	9,95
	24K	0,012	0,001	-
	48	0,039	0,004	6,01
	72	0,050	0,003	11,77
	168	N	N	N
	168K	0,020	0,002	-
C ₃ = 0,1	6	0,010	0,002	1,26
	12	N	N	N
	24	N	N	N
	24K	0,012	0,001	-
	48	0,010	0,001	6,33
	72	0,010	0,002	5,00
	168	0,020	0,004	0,00
	168K	0,020	0,002	-

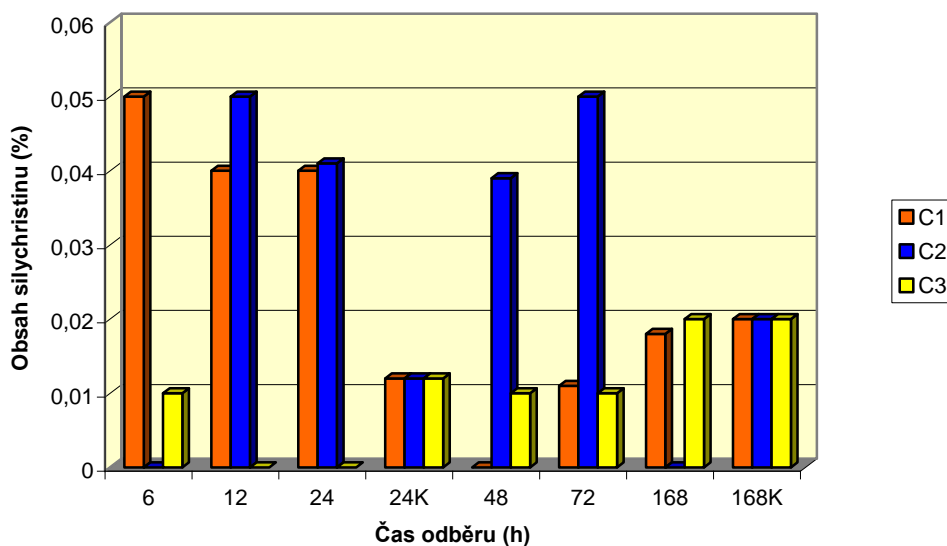
K.....kontrola

N.....neměřitelná hodnota

Graf č. 1
Obsah silychristinu v kalusové kultuře
Silybum marianum (L.) Geartn.



Graf č. 2
Porovnání obsahu silychristinu v závislosti na čase odběru v kalusové kultuře
Silybum marianum (L.) Gaertn.



Tabulka č. 2 - Obsah silychristinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.)

Gaertn.

Elicitor: peroxid vodíku

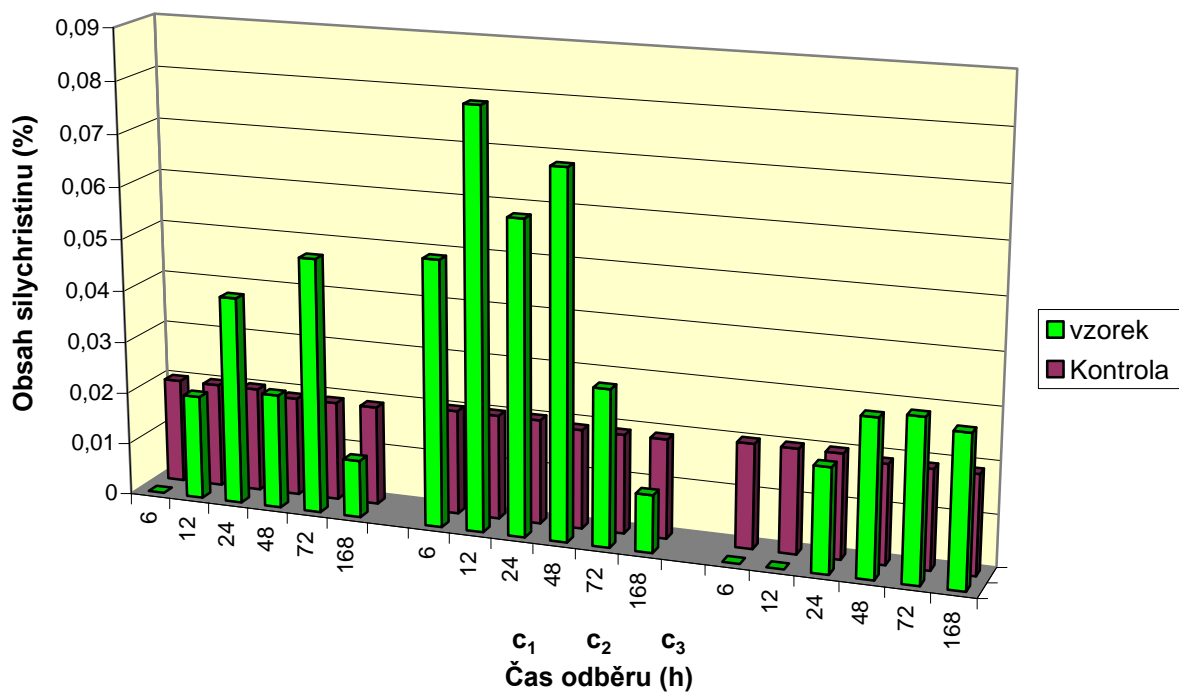
Koncentrace elicitoru (mol/l)	Hodina odběru	Obsah silychristinu (%)	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C ₁ = 10,0	6	N	N	-
	12	0,020	0,002	0,00
	24	0,040	0,002	10,00
	24K	0,020	0,002	-
	48	0,022	0,002	1,18
	72	0,049	0,004	8,49
	168	0,011	0,003	2,67
	168K	0,019	0,003	-
C ₂ = 1,0	6	0,051	0,003	12,16
	12	0,080	0,002	30,00
	24	0,060	0,002	20,00
	24K	0,020	0,002	-
	48	0,070	0,004	14,43
	72	0,030	0,003	3,67
	168	0,011	0,001	3,58
	168K	0,019	0,003	-
C ₃ = 0,1	6	N	N	N
	12	N	N	N
	24	0,020	0,005	0,00
	24K	0,020	0,002	-
	48	0,030	0,004	3,11
	72	0,031	0,004	3,39
	168	0,029	0,004	2,83
	168K	0,019	0,003	-

K.....kontrola

N.....neměřitelná hodnota

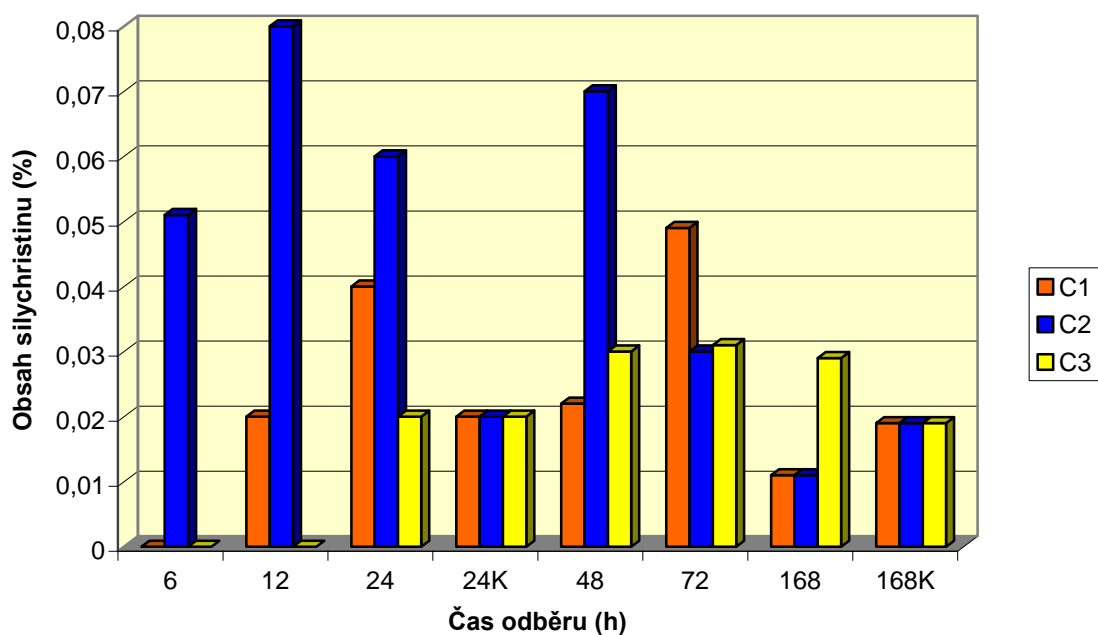
Graf č. 3

Obsah silychristinu v suspenzní kultuře
Silybum marianum (L.) Gaertn.



Graf č. 4

Porovnání obsahu silychristinu v závislosti na čase odběru v suspenzní kultuře
Silybum marianum (L.) Gaertn.



Tabulka č. 3 - Obsah taxifolinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.)

Gaertn.

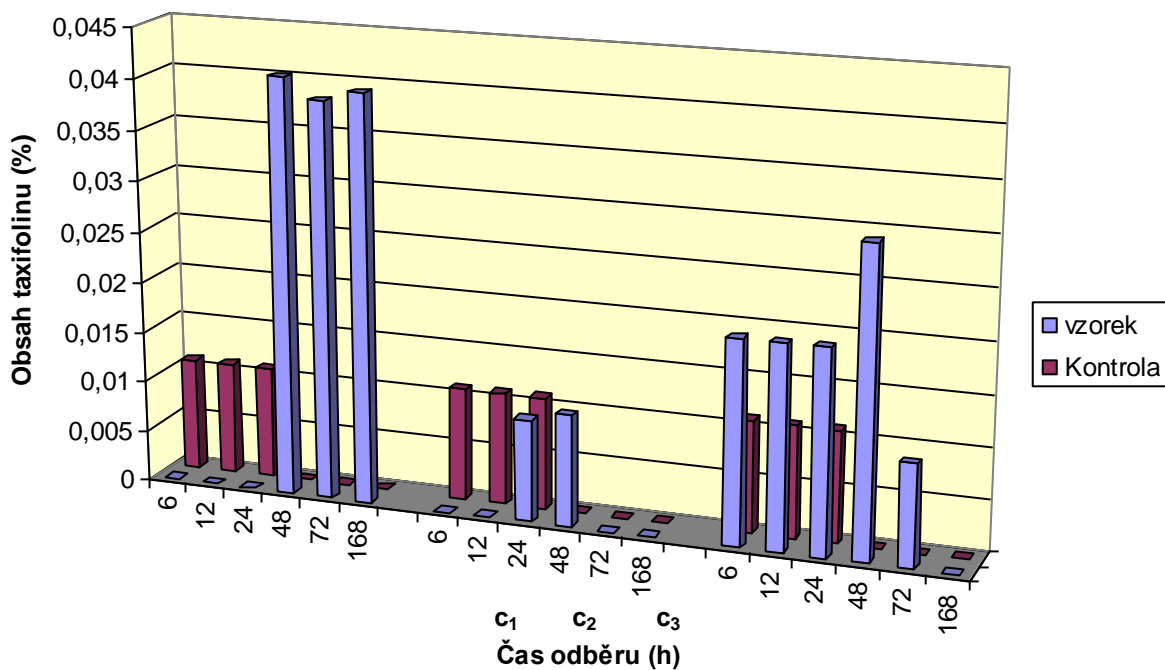
Elicitor: peroxid vodíku

Koncentrace elicitoru (mol/l)	Hodina odběru	Obsah taxifolinu (%)	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C ₁ = 10,0	6	N	N	N
	12	N	N	N
	24	N	N	N
	24K	0,011	0,001	-
	48	0,041	0,004	-
	72	0,039	0,004	-
	168	0,040	0,004	-
	168K	N	N	-
C ₂ = 1,0	6	N	N	N
	12	N	N	N
	24	0,010	0,001	1,00
	24K	0,011	0,001	-
	48	0,011	0,003	-
	72	N	N	N
	168	N	N	N
	168K	N	N	-
C ₃ = 0,1	6	0,020	0,002	5,69
	12	0,020	0,005	2,50
	24	0,020	0,004	3,09
	24K	0,011	0,001	-
	48	0,030	0,004	-
	72	0,010	0,002	-
	168	N	N	N
	168K	N	N	-

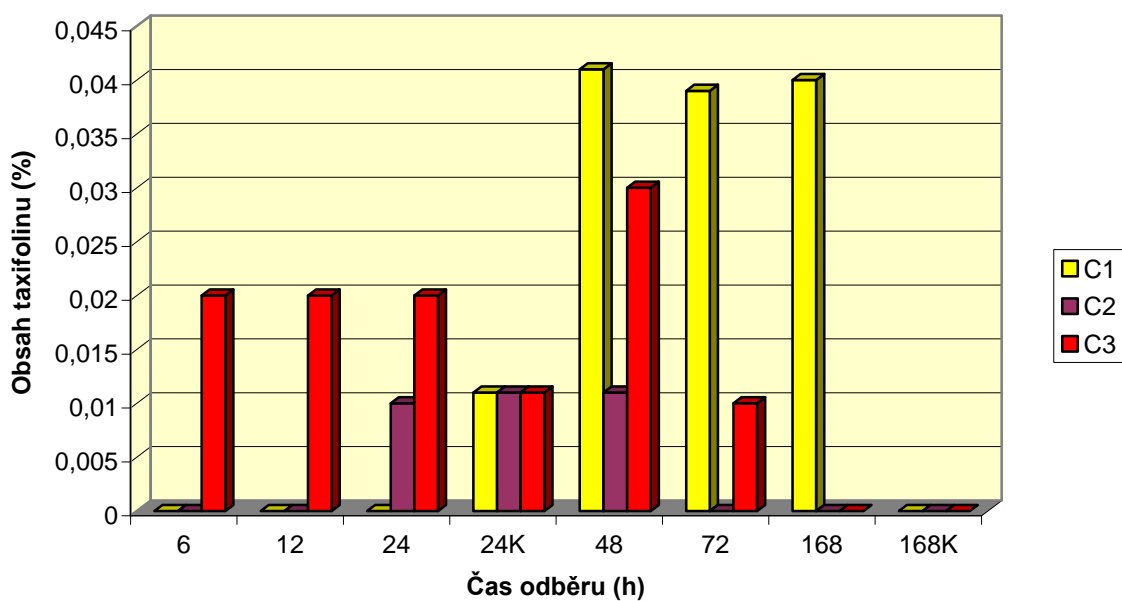
K.....kontrola

N.....neměřitelná hodnota

Graf č. 5
Obsah taxifolinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn.



Graf č. 6
Porovnání obsahu taxifolinu v závislosti na čase odběru v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn.



Tabulka č. 4 - Obsah taxifolinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.)

Gaertn.

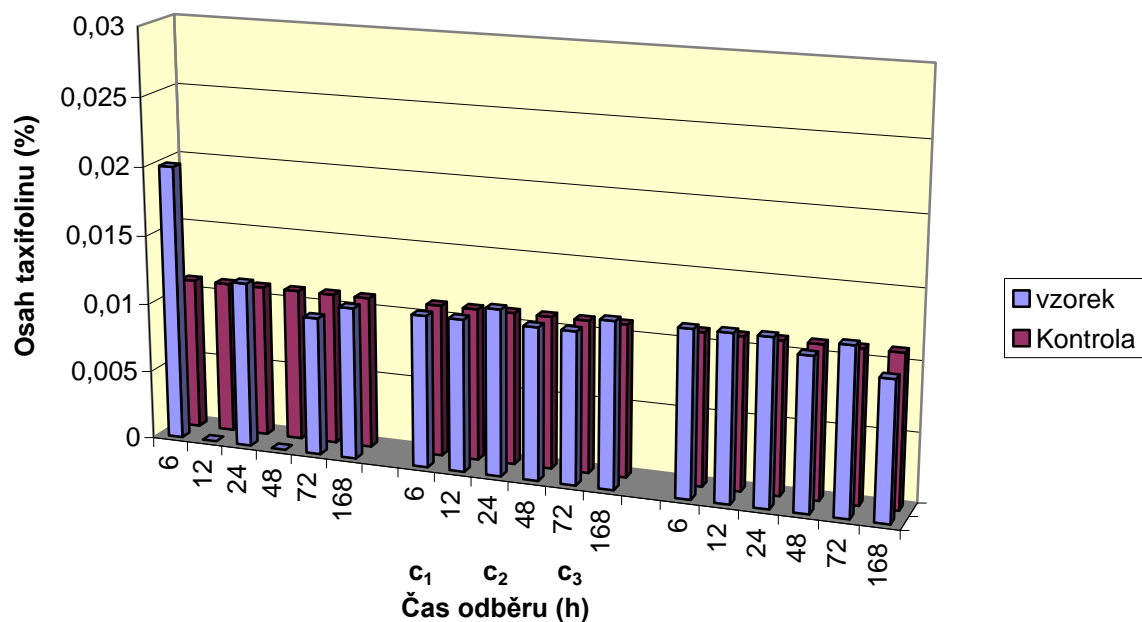
Elicitor: peroxid vodíku

Koncentrace elicitoru (mol/l)	Hodina odběru	Obsah taxifolinu (%)	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C ₁ = 10,0	6	0,020	0,002	5,69
	12	N	N	N
	24	0,012	0,003	0,45
	24K	0,011	0,001	-
	48	N	N	N
	72	0,010	0,001	0,45
	168	0,011	0,003	0,00
	168K	0,011	0,003	-
C ₂ = 1,0	6	0,011	0,001	0,00
	12	0,011	0,002	0,00
	24	0,012	0,004	0,34
	24K	0,011	0,001	-
	48	0,011	0,002	0,00
	72	0,011	0,001	0,00
	168	0,012	0,004	0,28
	168K	0,011	0,003	-
C ₃ = 0,1	6	0,012	0,002	0,26
	12	0,012	0,002	0,26
	24	0,012	0,004	0,34
	24K	0,011	0,001	-
	48	0,011	0,003	0,00
	72	0,012	0,004	0,28
	168	0,010	0,001	0,45
	168K	0,011	0,003	-

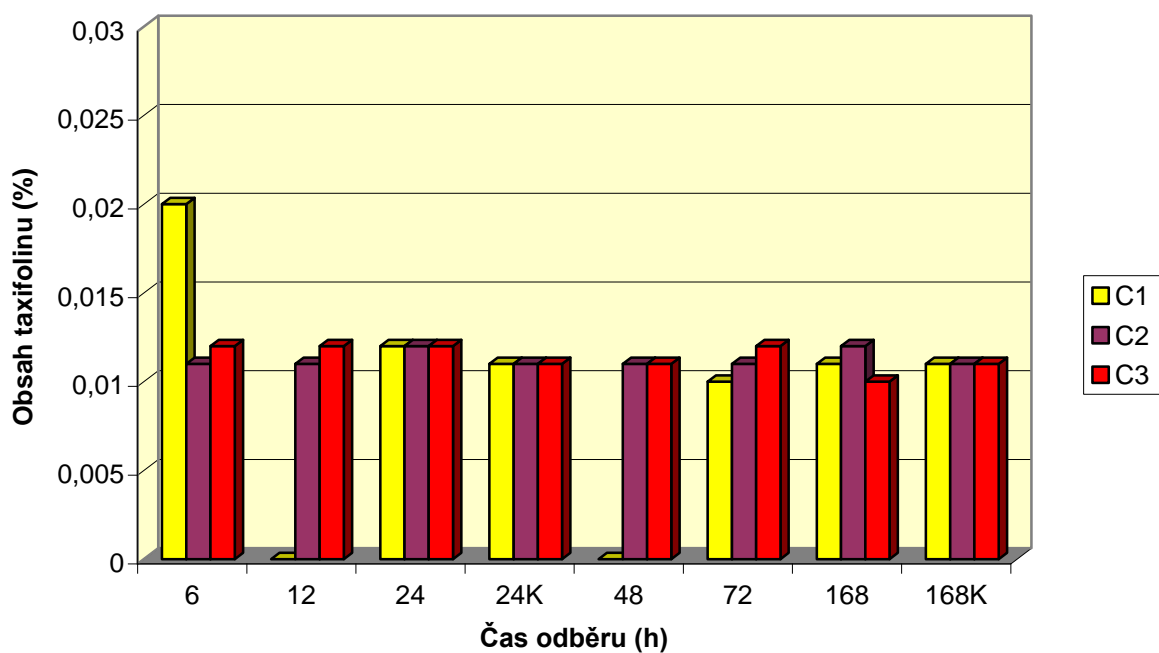
K.....kontrola

N.....neměřitelná hodnota

Graf č. 7
Obsah taxifolinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn.



Graf č. 8
Porovnání obsahu taxifolinu v závislosti na čase odběru v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn



Tabulka č. 5 - Obsah flavonolignanů a taxifolinu v kultivačním médiu kalusových a suspenzních kultur *Silybum maranum* (L.) Gaertn.

Elicitor: peroxid vodíku

Typ kultury, koncentrace elicitoru, hodina odběru	taxifolin (%)	silychristin (%)	silibin A (%)	isosilibin (%)
Kalus; 1,0 mol/l; 24h	-	-	-	-
Susp.; 10,0mol/l; 12h	-	-	-	-
Susp.; 10,0mol/l; 48h	0,0020	0,0019	-	-
Susp.; 10,0mol/l; 72h	-	0,002	-	-
Susp.; 10,0mol/l; 168h	0,0040	-	0,0020	0,0020
Susp.; 1,0mol/l; 24h	-	0,0017	-	-
Susp.; 1,0mol/l; 48h	0,0038	0,0020	-	-
Susp.; 1,0mol/l; 72h	-	-	-	-
Susp.; 1,0mol/l; 168h	-	-	-	0,0018
Susp.; 0,1mol/l; 48h	-	-	-	-
Susp.; 0,1mol/l; 72h	-	-	-	-

Ve výše prezentovaných vzorcích kultivačního média byl také měřen silibin B, jehož přítomnost nebyla zjištěna.

6. DISKUSE

Díky širokému a významnému uplatnění v různých oborech jsou explantátové kultury velmi sledované.

V této diplomové práci bylo cílem zhodnotit, zda oxidační stres zvyšuje tvorbu flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Jako elicitor byl použit peroxid vodíku, a to ve třech různých koncentracích ($c_1=10,0$ mol/l; $c_2=1,0$ mol/l; $c_3=1,0$ mol/l).

Na základě experimentální práce K. Gallové, která sestavila růstovou a produkční křivku pro tuto kulturu, byl stanoven jako optimální den pro přidání elicitoru ke kulturám *Silybum marianum* 30. den po subkultivaci.

Na tomto základě bylo pro kultivaci u této práce použito MS médium s růstovým regulátorem α -NAA (10 mg/l).

Po aplikaci elicitoru byly prováděny odběry za 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Kontroly byly odebírány po 24 a 168 hodinách.

Obsah flavonolignanů byl stanoven metodou HPLC, která zaručuje vysokou citlivost.

Kalusová kultura (tab. č. 1,3 graf č. 1,2,5,6)

Statisticky významný nárůst obsahu flavonolignanů byl zjištěn po aplikaci elicitoru (H_2O_2) pouze u dvou prvních koncentrací, a to c_1 po 6 hodinách (o 317% oproti kontrole), 12 a 24 hodinách (o 233% oproti kontrole) a u koncentrace c_2 po 12 hodinách (o 317% oproti kontrole), 24 hodinách (o 242% oproti kontrole), 48 hodinách (o 95% oproti kontrole) a 72 hodinách (o 150% oproti kontrole). Detekována byla i produkce taxifolinu.

U koncentrace c_3 došlo k poklesu produkce flavonolignanů po 48 a 72 hodin o 100% oproti kontrolnímu vzorku, po 12 a 24 hodinách byly hodnoty tak nízké, že je nebylo možno detekovat ani pomocí HPLC. Také nezměřitelné hodnoty obsahu flavonolignanů byly zjištěny u koncentrace c_1 po 48 hodinách a u koncentrace c_2 po 6 a 168 hodinách.

Další snížení produkce flavonolignanů nastalo po působení elicitoru u koncentrace c_1 po 72 hodinách (o 81% v porovnání s kontrolou).

Nejvyšší obsah flavonolignanů byl naměřen po elicitaci peroxidem vodíku v koncentraci c_2 po 12 hodinách a 6 hodinách u c_1 . Nárůst činil 317% ve srovnání s kontrolou.

Z flavonolignanů byla v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. zjištěna jen přítomnost silychristinu. Ostatní měřené složky silymarinového komplexu (silydianin, silybin A, silybin B, izosilybin A a izosilybin B) nebyly prokázány.

Suspenní kultura (tab. č.2,4 graf č. 3,4,7,8)

V práci bylo prokázáno statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů u suspenní kultury po elitaci peroxidem vodíku u koncentrace c_1 po 24 hodinách o 100% a po 72 hodinách o 157% v porovnání s kontrolou, u koncentrace c_2 po 6 hodinách o 155%, 12 hodinách o 300%, 24 hodinách o 200%, 48 hodinách o 268% a po 72 hodinách o 58% v porovnání s kontrolou a u koncentrace c_3 po 48 hodinách o 58%, 72 hodinách o 63% a po 168 hodinách o 53% ve srovnání s kontrolou.

Statisticky významné snížení obsahu flavonolignanů bylo zaznamenáno po aplikaci elicitoru u koncentrace c_2 po 168 hodinách o 72% v porovnání s kontrolním vzorkem.

Suspenní kultura produkovala nejvyšší množství flavonolignanů po aplikaci elicitoru o koncentraci c_2 po 12 hodinách, a sice o 300% oproti kontrole.

Stanoveným flavonolignanem byl opět pouze silychristin.

Stejně jako u kalusové kultury byla prokázána přítomnost taxifolinu.

U obou *in vitro* kultur *Silybum marianum* (L.) Gaertn. byla zaznamenána nejvyšší produkce flavonolignanů po působení elicitoru o koncentraci c_2 po 12 hodinách, a poté klesala.

V buňkách kalusové i suspenní kultury *Silybum marianum* (L.) Gaertn. po elicitaci peroxidem vodíku byl detekován pouze silychristin a taxifolin. Do živného média se vylučovaly i silybin A a izosilybin B, ostatní složky silymarinového komplexu nebyly detekovány. (tab.č. 5)

Látky vylučované do média byly po elitaci peroxidem vodíku pouze v tisícínovém množství, tzn. o řád nižší ve srovnání s kontrolou.

V rigorózní práci K. Gallové byla prokázána elicitální aktivita 3-methylanilid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny [látka č. 1] a (5-brom-2-hydroxyfenyl)amid 5-*terc.*butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny [látka č. 2] na produkci flavonolignanů kalusovou a suspenzní kulturou *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Vlastní elicitace byla provedena u obou testovaných látek (elictorů) ve čtyřech koncentracích.

U látky č. 1 byly použity tyto koncentrace: c_1 100 mg/l ($3,71 \cdot 10^{-4}$ mol/l); c_2 10 mg/l ($3,71 \cdot 10^{-5}$ mol/l); c_3 1,0 mg/l ($3,71 \cdot 10^{-6}$ mol/l); c_4 0,1 mg/l ($3,71 \cdot 10^{-7}$ mol/l) a u látky č. 2: c_1 100 mg/l ($2,59 \cdot 10^{-4}$ mol/l); c_2 10 mg/l ($2,59 \cdot 10^{-5}$ mol/l); c_3 1,0 mg/l ($2,59 \cdot 10^{-6}$ mol/l); c_4 0,1 mg/l ($2,59 \cdot 10^{-7}$ mol/l).

Po elicitaci byly dělány odběry po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Kontroly byly odebírány po 24 a 168 hodinách.

V kalusové kultuře c_1 s přidávkem α -NAA (10 mg/l) jako růstového regulátoru došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů pouze u koncentrace c_4 po 12 hodinové (o 154% oproti kontrole) elicitaci látkou č. 1. Po 24, 48, 72 a 168 hodinách se obsah flavonolignanů nezvýšil – naopak poklesl oproti kontrole. U koncentrace c_1 , c_2 a c_3 obsah flavonolignanů oproti kontrole statisticky významně poklesl. V suspenzní kultuře elicitace látkou č. 1 na rozdíl od kalusové kultury vyvolala statisticky významné zvýšení u prvních dvou koncentrací elictoru, a to v koncentraci c_1 po 24 hodinové elicitaci a po 48 hodinové elicitaci touto látkou o koncentraci c_2 . U koncentrací c_3 a c_4 došlo k tak malé produkci flavonolignanů po elicitaci látkou č. 1, že tyto hodnoty nebyly měřitelné ani tak citlivou metodou jako je HPLC. Maximální produkce bylo dosaženo po 48 hodinové elicitaci koncentrací c_2 . Nárůst činil 250%. V tomto případě byl v kalusu také kromě silychristinu produkován v detekovaném množství i taxifolin.

Elicitace látkou č. 2 v kalusové kultuře vyvolala nárůst obsahu flavonolignanů především po 12 a 24 hodinové elicitaci testovanými koncentracemi c_1 , c_2 a c_3 ; dále látkou o koncentraci c_2 po 72 hodinové elicitaci a látkou o koncentraci c_3 po 48 hodinové elicitaci. [55]

J. Římáková také zjistila produkci taxifolinu a izosilybinu A do kultivačního média kalusové kultury *Silybum marianum* (L.) Gaertn. K maximálnímu zvýšení obsahu taxifolinu a izosilybinu A v médiu došlo 12 hodin po elicitaci UV zářením o vlnové délce 254nm a době působení 60 minut (o 220%, res. 291%).

K maximálnímu zvýšení obsahu taxifolinu v médiu suspenzní kultury *Silybum marianum* (L.) Gaertn. došlo 12 hodin po aplikaci 16,07 mg/l chitosanu (o 596% oproti kontrole). [56]

Zatímco u této práce produkce taxifolinu nebyla elicitací peroxidem vodíku nikterak významně ovlivněna v porovnání s kontrolou. S výjimkou 6 a 24 hodinové elicitace peroxidem vodíku o koncentraci c_3 nastalo zvýšení produkce taxifolinu o 82% v porovnání s kontrolou u kalusové kultury a u suspenzní kultury po 6 hodinové elicitaci peroxidem vodíku o koncentraci c_1 .

K. Gallová pomocí HPLC prokázala v kulturách *Silybum marianum in vitro* též pouze silychristin. [55]

J. Římková však na základě HPLC detekovala taxifolin a silydianin. Silydianin byl detekován jednak v živném médiu, zejména však v buňkách kultury v kontrolních vzorcích. Signifikantní nárůst jeho obsahu byl sledován v buňkách kultury 72 hodin po aplikaci 46 μ m koniferylalkoholu (prekurzoru nezbytného k biosyntéze flavonolignanů). Taxifolin byl vylučován pouze do média. [56]

7. ZÁVĚR

Po zhodnocení výsledků můžeme dojít k těmto závěrům:

U kalusové kultury

- Ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů oproti kontrole došlo v kalusové kultuře po aplikaci roztoku elicitoru u koncentrace c_1 po 6, 12 a 24 hodinách a u koncentrace c_2 po 12, 24, 48 a 72 hodinách. U této kultury byla též zaznamenána produkce taxifolinu.
- Maximální zvýšení obsahu flavonolignanů nastalo v kalusové kultuře u koncentrace c_2 po 12 hodinách, a to o 317% v porovnání s kontrolou.
- Ke snížení obsahu flavonolignanů oproti kontrole došlo v kalusové kultuře u koncentrace c_1 po 72 hodinách o 81% a o 100% po 48 a 72 hodinách u koncentrace c_3 .
- Obsah flavonolignanů pod mezí citlivosti metody stanovení byl u koncentrace c_1 po 48 hodinách, u koncentrace c_2 po 6 a 168 hodinách a u koncentrace c_3 po 12 a 24 hodinách.

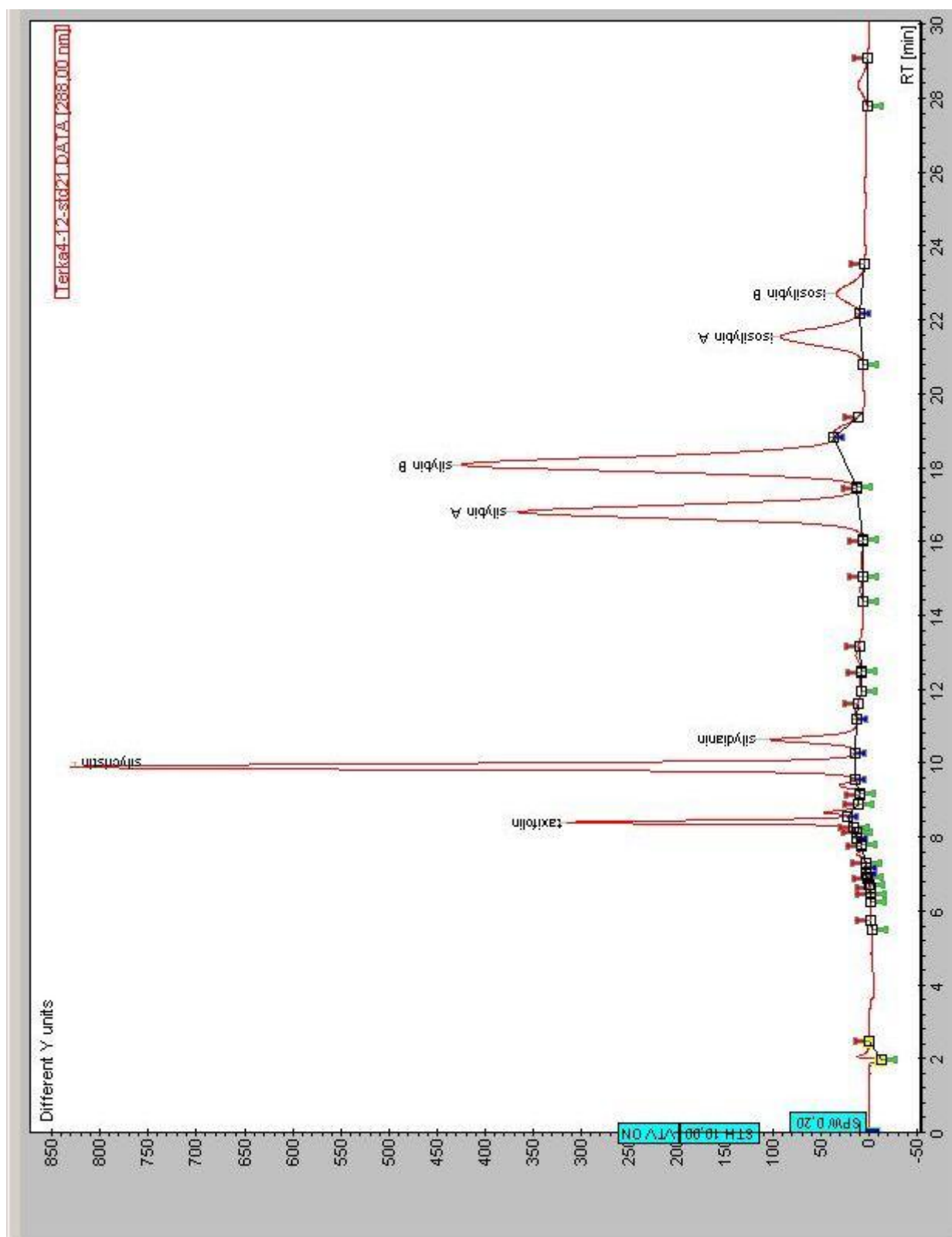
U suspenzní kultury

- Statisticky významné zvýšení produkce flavonolignanů bylo prokázáno v suspenzní kultuře po aplikaci roztoku elicitoru oproti kontrole u koncentrace c_1 po 24 a po 72 hodinách, u koncentrace c_2 u všech odběrů kromě odběru po 168 hodinách a u koncentrace c_3 po 48, 72 a 168 hodinách. Byla zde také zaznamenána produkce taxifolinu.
- Maximální zvýšení obsahu flavonolignanů bylo zjištěno v suspenzní kultuře u koncentrace c_2 po 12 hodinách, což bylo o 300% v porovnání s kontrolou.
- Produkce flavonolignanů byla snížena oproti kontrole o 72% po 168 hodinách u koncentrace c_1 i koncentrace c_2 .
- Neměřitelné hodnoty byly zjištěny u koncentrace c_1 po 6 hodinách a u koncentrace c_3 po 6 a 12 hodinách.

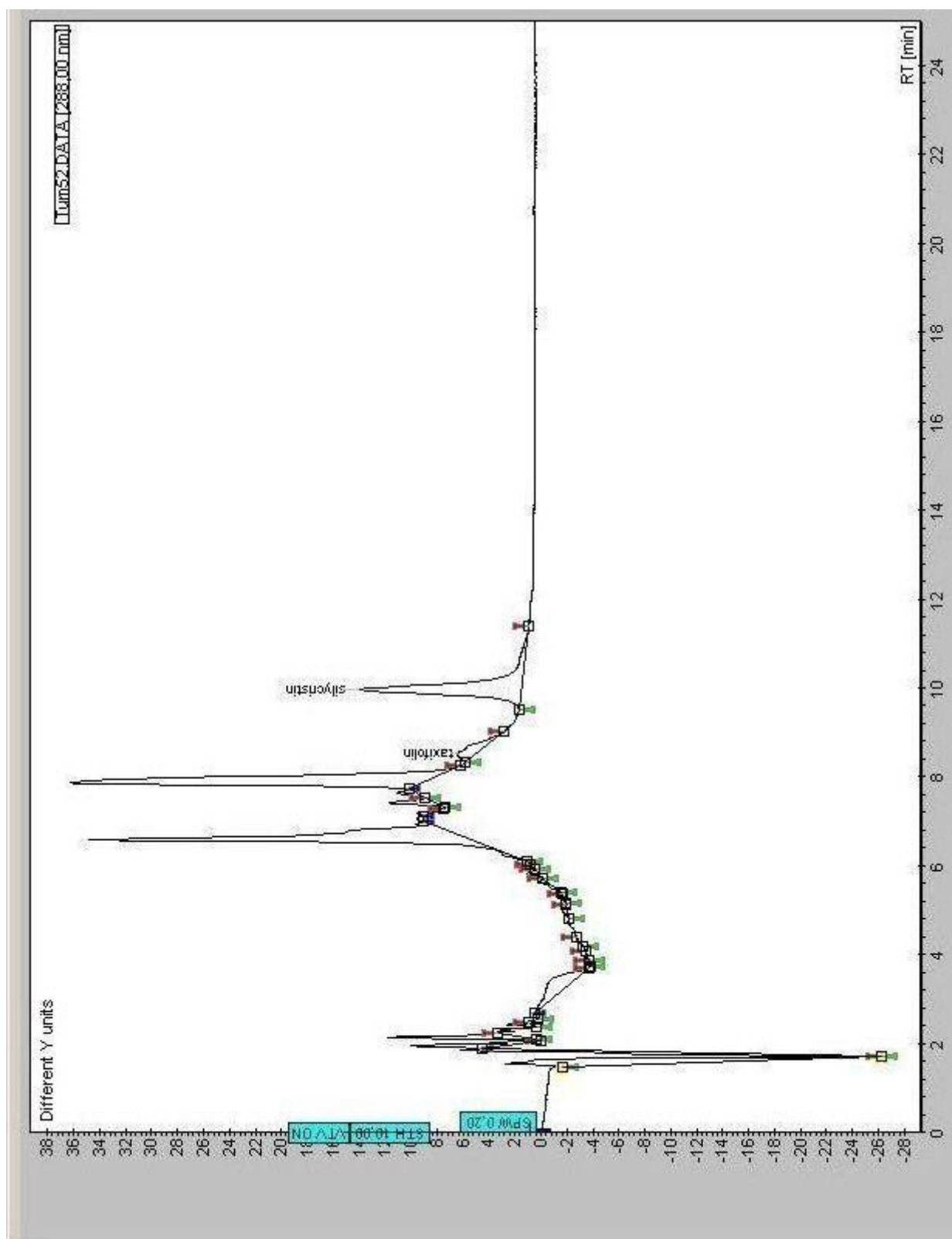
Tímto experimentem byl prokázán vliv oxidačního stresu peroxidu vodíku na produkci flavonolignanů kalusovou a suspenzní kulturou *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

8. PŘÍLOHY

Záznam HPLC analýzy standardu



Záznam HPLC analýzy suspenzní kultury



9. SEZNAM LITERATURY

- [1] Beneš K.: Zelená lékárna, Lidové nakladatelství Praha, 7-11 (1985)
- [2] <http://www.medon-solutio.cz/online2005/index.php?linkID=txt118lang=1>, Léčivé rostliny
- [3] Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha, 75-80 (2001)
- [4] <http://old.mendelu.cz/~kizk/publikace/pdf/2006/Explantatove%20kultury%20rostlin-2006-2007.ppt>
- [5] Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně Ústí nad Labem, 1-87 (1995)
- [6] Dušek J., Dušková J., Tůmová L., Spilková J.: Biotechnologické využití kultur vyšších rostlin *in vitro*, Česká a slovenská farmacie, 45 (4), 204-212 (1996)
- [7] Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 412, 413, 421-426, 429, 430 (1998)
- [8] Tůmová L., Polívková D.: Vliv AgNO na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro*, Česká a slovenská farmacie, 55 (4), 186-188 (2006)
- [9] Tischlerová I.: Bylinář (Informační systém bylin a bylinných přípravků), Medosoft, 2 (2006)
- [10] Korbelař J., Endris Z.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum Praha, 306, (1981)
- [11] Opletal L., Volák J.: Rostliny pro zdraví, Aventinum Nakladatelství s.r.o., 150, 151 (1999)
- [12] Tůmová L., Gallová K.: Terapeutické účinky *Silybum marianum*, Praktické lékařství, (4) 185-187 (2006)
- [13] WHO monographs on selected medicinal plants, Volume 2, World Health Organization Geneva, 300, 303 (2002)
- [14] <http://www.AISLP>
- [15] Škottová N., Ulrichová J., Křen V., Urbaníková J., Šimánek V.: Flavonoidy silymarinu a polynenasycené mastné kyseliny rybízového

oleje jako nutraceutikum v prevenci chronických onemocnění, Praktický lékař (8), volná příloha (2003)

- [16] Flocco C.G., Alvarez M.A., Giulietti A.M.: Peroxidase production *in vitro* by *Armoracia lapathifolia* (horseradish) – transformed root cultures effect of elicitation on level and profile of isoenzymes, *Biotechnology and applied biochemistry* 28 (1), 33-38, Part 1 (1998)
- [17] Zhao J., Hu Q., Guo Z.Q., Zho W.H.: Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca^{2+} influx and the oxidative burst, *Plant Science*, 161 (3), 423-431 (2001)
- [18] Sanchez-Sampedro M.A., Fernandez-Tarrago J., Corchete P.: Yest extract and methyl jasmonat-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *Journal of Biotechnology*, 119 (1), 60-69 (2005)
- [19] Hu F.X., Huang J.H., Xu Y.F., Gian X.H., Zhong J.J.: Response of defense signale, biosynthetic gene transcription and taxoid biosynthesis to elicitation by a novel sythetic jasmonate in cell cultures of *Taxus chinensis*, *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (6), 1064-1071 (2006)
- [20] Yuan Y.J., Li J.C., Ge Z.Q., Wu J.C.: Superoxide anion burst and taxol production induced by Ce^{4+} in suspension cultures of *Taxus cuspidata*, *Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic*, 18 (4-6), 251-260 (2002)
- [21] Řimáková J., Tůmová L.: Sborník příspěvků 2004, Konference Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, 15. 9. 2004, AF ČZU Praha
- [22] Siatka T., Kašparová M.: Vliv auxinů na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L., *Česká a slovenská farmacie* 52 (4), 186-188 (2003)
- [23] Kolektiv autorů: Český lékopis 1997, svazek 1., Grada Praha, 131 (1997)
- [24] Kolektiv autorů: Český lékopis 2005, Grada Publishing, a.s., elektronická verze (2005)
- [25] Kašparová M., Siatka T.: Vliv kyseliny salicylové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro.*, *Česká a slovenská farmacie*, 51 (4), 177-181 (2002)

- [26]/ Kašparová M., Siatka T., Dušek J.: Vliv kyseliny jasmínové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro.*, Česká a slovenská farmacie, 52 (3), 148-151 (2003)
- [27] Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R.: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, *Biotechnology advance*, 23 (4), 283-333 (2005)
- [28] Patykowski J.: Role hydrogen peroxide and apoplasic peroxidase in tomato – *Botrytis cinerea* interaction, *Acta physiologiae plantarum*, 28 (6), 589-598 (2006)
- [29] Carter C., Healy R., O'Tool N.M., Naqui S.M.S. et al.: Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms, *Plant physiology*, 143 (1), 389-399 (2007)
- [30] Samadi L., Behboodi B.S. : Fusarios acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: role of caspase-like activity, cytochrom c, and H₂O₂, *Planta*, 225 (1), 223-234 (2006)
- [31] Wu J., Lin L.: Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (1), 51-57 (2002)
- [32] Lee S.C., Hwang B.K.: Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*, *Planta* 221 (6), 790-800 (2005)
- [33] Wendehenne D., Lammote O., Frachisse J.M., Barrier-Brygoo H., Pugin A.: Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense response and hypersensitive cell death in tobacco, *Plant cell*, 14 (8), 1937-1951 (2002)
- [34] Ke D.S., Sun G.C.: The effect reactive oxygen species on ethylene production induced by osmotic stress in etiolated mungbean seeding, *Plant growth regulation*, 44 (3), 199-206 (2004)
- [35] Lin L.D., Wu J.Y, Ho K.P., Qi S.Y.: Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (Saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures, *Ultrasound in medicine and biology*, 27 (8), 1147-1152 (2001)

- [36] Yoshimura K., Miyao K., Gaber A., Takeda T., et al.: Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol, *Plant journal*, 37 (1), 21-33 (2004)
- [37] Sersen F., Vencel T., Annus J.: Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals, *Fitoterapia* 77 (7-8), 525-529 (2006)
- [38] Ahmed E., Noor A.T., Malik A., Ferheen S., Afza N.: Structural determination of silymins A and B, new pentacyclic triterpenes from *Silybum marianum*, by 1D and 2D NMR spectroscopy, *Magnetic resonance in chemistry*, 45 (1), 79-81 (2007)
- [39] Del Rio-Celestino M., Font R., Moreno-Rojas R., De Haro-Bailon A.: Uptake of lead and zinc by wild plants growing on contaminated soils, *Industrial crops and products*, 24 (3), 230-237 (2006)
- [40] Gazak R., Waltrova D., Kren V.: Silybin and silymarin – New and emerging applications in medicine, *Current Medicinal Chemistry*, 14 (3), 315-338 (2007)
- [41] Flaig T.W., Gustavson D.L., Su L.J., Zirrolli J.A., et al.: A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patient, *Investigation new drugs*, 25 (2), 139-146 (2007)
- [42] Huseini H.F., Larijani B., Heshmat R., Fakhrzadeh H., et al.: The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Silymarin) in the treatment of type II diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial, *Phytotherapy research*, 20 (12), 1036-1039 (2006)
- [43] Samu Z., Nyiredy S., Baitz-Gacs E., Varga Z., et al.: Structure elucidation and antioxidant activity of (-)-isosilandrin isolated from *Silybum marianum* (L.), *Chemistry & Biodiversity*, 1 (11), 1668-1677 (2004)
- [44] Tedesco D., Steidler S., Galletti S., Tameni M., et al.: Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B-1 in broiler chicks, *Poultry Science*, 83 (11), 1839-1843 (2004)
- [45] Osuchowski M.F., Johnson V.J., He Q.R., Sharma R.P.: Alterations in regional brain neurotransmitters by silymarin, a natural antioxidant flavonoid mixture, in BALB/c mice, *Pharmaceutical Biology* 42 (4-5), 384-389 (2004)

- [46] Li L.H., Wu L.J., Zhou B., Wu Z., et al.: Silymarin prevents UV irradiation-induced A375-S2 cell apoptosis, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27 (7), 1031-1036 (2004)
- [47] Sanchez-Sampedro M.A., Fernandez-Tarrago J., Corchete P.: Enhanced Silymarin accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *Journal of Plant Physiology*, 162, 1177-1182 (2005)
- [48] Reisenauer R.: *Metody matematické statistiky*, SNTL Praha, 78-81 (1970)
- [49] Lin L.D., Wu J.Y.: Enhancement of shikonin production in single – and two-phase suspension cultures of *Lipthospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound, *Biotechnology and Bioengineering*, 78 (1), 81-88 (2002)
- [50] Wu J., Lin L.: Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound methyl jasmonate and *in situ* solvent extraction, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62 (2-3), 151-155 (2003)
- [51] Zhang C.H., Yan Q., Chenk W.K., Wu J.Y.: Enhancement of tanshione production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding, *Planta Medica*, 70 (2), 147-151 (2004)
- [52] Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C., Giulietti A.M.: The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2-4), 252-258 (2000)
- [53] Zhao D.X., Fu C.X., Han Y.S., Lu D.P.: Effects of elicitation on jaceosidin and hispidulin production in cell suspension cultures of *Saussurea medusa*, *Process Biochemistry*, 40 (2), 739-745 (2005)
- [54] Skyta B., Dušek J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*, Karolinum Praha, 87 (1992)
- [55] Gallová K.: Ovlivnění tvorby sekundárních metabolitů u kultur léčivých rostlin *in vitro*, (Rigorózní práce), FaF UK, Hradec Králové (2003)
- [56] Řimáková J.: Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů kulturami léčivých rostlin *in vitro*, (Disertační práce), FaF UK, Hradec Králové (2005)

[57] Murashige T., Skoog F.: J. Plant Physiology, 15, 43 (1963)