

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognozie

Diplomová práce

Kultury léčivých rostlin *in vitro* – IXX

Markéta Seidlová

Vedoucí katedry:	Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.
Vedoucí diplomové práce:	Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.
Oponent:	PharmDr. Jan Martin, PhD.
Termín odevzdání:	9. 5. 2016
Počet stran:	74

Prohlášení:

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

V Hradci Králové, dne 9. 5. 2016

Poděkování:

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a rady při vypracování této práce a PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za pomoc při analýze vzorků pomocí HPLC. Zároveň bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry farmakognozie za vstřícný přístup při vypracování laboratorní části práce.

ABSTRAKT

Kultury léčivých rostlin *in vitro* – IXX

Tato práce se zabývá možností ovlivnění produkce sekundárních metabolitů *in vitro* kultur *Silybum marianum* L. metodou elicitace. V této studii byl použit jako elicitor oxid seleničitý v koncentracích $9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l; $9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $9,012 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Vzorky byly odebrány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách působení elicitoru. Výsledky byly porovnávány s kontrolními vzorky, které byly kultivovány bez elicitace. Analýza vzorků probíhala metodou HPLC. Výsledky ukázaly, že téměř všechny sledované metabolity byly vyplaveny do živného média. V buňkách kalusových a suspenzních kultur bylo detekováno pouze nepatrné množství taxifolinu (0,01 mg/g DW).

V médiích kalusových i suspenzních kultur bylo zaznamenáno vyplavování taxifolinu i silymarinového komplexu jak u kontrolních, tak u elicitovaných vzorků. Elicitací došlo ke statisticky významným nárůstům obsahu taxifolinu i složek silymarinového komplexu. Statisticky nejvýznamnější vyplavení flavonolignanů (2,2 mg/100 ml) do média suspenzní kultury nastalo po 72 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_1 ($9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l). V médiu kalusové kultury bylo dosaženo statisticky nejvyšší hodnoty obsahu flavonolignanů po 168 hodinovém působení (1,64 mg/100 ml) elicitoru o koncentraci c_2 ($9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l). Zkoumaný elicitor byl schopen zvýšit i produkci taxifolinu. Statistické zvýšení obsahu taxifolinu (4,05 mg/100 ml) v médiu suspenzní kultury bylo nejvyšší po 48 hodinovém působení elicitoru o koncentraci c_1 ($9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l) a v médiu kalusové kultury byl nevyšší statistický nárůst (2,8 mg/100 ml) zaznamenán po 48 hodinách působení SeO_2 o koncentraci c_2 ($9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l).

ABSTRACT

In vitro cultures of medicinal plants – IXX

The subject of this thesis is the evaluation of secondary metabolites production in *in vitro* cultures of *Silybum marianum* L. after elicitor treatment. In this study selenium dioxide as elicitor in concentrations of $9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l; $9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l; $9,012 \cdot 10^{-5}$ mol/l was used. The samples were taken after 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours of elicitor treatment. The effect of elicitor was compared with control samples, which were cultured without elicitation. The content of taxifolin and flavonolignans was determined by the method of HPLC. The results showed, that almost all observed metabolites were released into a nutrient medium. Cells of callus and suspension cultures produced only small amounts of taxifolin (0.01 mg/g DW).

Taxifolin and silymarin complex releasing into nutrient media was observed as in control and also in the elicited samples of callus and suspension cultures. Selenium dioxide elicitation caused statistically significant increases in releasing taxifolin and silymarin complex into the nutrient medium. The statistically significant releasing of flavonolignans (2.2 mg/100 ml) to the medium of suspension culture was reached after 72 hours of treatment with selenium dioxide in concentration of c_1 ($9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l). The statistically significant flavonolignans production in the nutrient medium of callus culture after 168 hours elicitor application (1.64 mg/100 ml) in concentration of c_2 ($9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l) was reached. Selenium dioxide also was able to increase taxifolin production. The statistically significant taxifolin releasing (4.05 mg/100 ml) into the nutrient medium of suspension culture was highest after 48 hours elicitor treatment in concentration of c_1 ($9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l). In medium of callus culture there was highest statistical significant taxifolin releasing (2.8 mg/100 ml) after 48 hours selenium dioxide application in concentration of c_2 ($9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l).

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Ostropestřec mariánský (<i>Silybum marianum</i>)	10
3.1.1 Charakteristika.....	10
3.1.2 Výskyt	10
3.1.3 Historie	11
3.1.4 Pěstování Ostropestřce mariánského v domácích podmínkách	11
3.1.5 <i>Silybum marianum</i> jako lékopisná droga	13
3.1.6 Použití.....	13
3.1.7 Mechanismus účinku silymarinu	14
3.1.8 Formy užívání	14
3.1.9 Kontraindikace, nežádoucí účinky, interakce	16
3.1.10 Obsahové látky	16
3.1.11 Biosyntéza flavonolignanů a jejich chemická struktura	17
3.2 Kultivace rostlin <i>in vitro</i>	19
3.2.1 Základní podmínky kultivace <i>in vitro</i> (21).....	19
3.2.2 Vysvětlení pojmů	19
3.2.3 Výhody a nevýhody explantátových kultur	20
3.2.4 Využití kultivace <i>in vitro</i>	21
3.3 Metoda elicitace	28
3.3.1 Rozdělení elicitorů (22).....	28
3.3.2 Průběh stresové reakce u rostlin.....	29
3.4 Selen (27) (28) (29)	30
3.4.1 Účinky selenu.....	30
3.4.2 Mechanismus toxicity selenu	30
3.4.3 Dosavadní studie na vliv selenu u rostlin	31
4 PRAKTICKÁ ČÁST	33
4.1 Pomůcky a přístrojové vybavení	33
4.2 Chemikálie	34
4.3 Rostlinný materiál	36
4.4 Příprava pomůcek ke kultivaci	36
4.5 Příprava živného média	36

4.6 Pasážování a kultivace	37
4.7 Příprava elicitoru	38
4.8 Elicitace <i>in vitro</i> kultur <i>Silybum marianum</i> L.	38
4.9 Příprava extraktů pro stanovení obsahu	39
4.10 Stanovení obsahu metodou HPLC	40
4.10.1 Obecná charakteristika HPLC	40
4.10.2 Parametry HPLC analýzy	40
4.10.3 Kalibrační křivky taxifolinu a jednotlivých flavonolignanů:	41
4.10.4 HPLC chromatogram standardu	45
4.11 Statistické zpracování výsledků (35) (36)	46
5 VÝSLEDKY	48
6 DISKUZE	59
7 ZÁVĚR	66
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	67
9 SEZNAM TABULEK	68
10 SEZNAM GRAFŮ	69
11 SEZNAM OBRÁZKŮ	70
12 BIBLIOGRAFIE	71

1 ÚVOD

Rostliny mají schopnost syntetizovat z živin kromě nepostradatelných složek svého těla i pestrout paletu nejrozmanitějších látek. Označují se jako sekundární metabolity a jsou specifické pro určitý biologický druh. (1) Funkce sekundárních metabolitů v těle rostlin byla již objasněna, hrají hlavní roli v adaptaci rostlin k vnějšímu prostředí a k překonávání stresových podmínek, čímž zajišťují rostlině ochrannou funkci. Vedle důležitosti, že hrají roli u rostlin v adaptaci na stres, mají jednoznačně praktickou aplikaci v lékařství, potravinářství a kosmetologii. Produkce těchto sloučenin je často nízká (méně než 1 % suché hmotnosti) a značně závisí na fyziologickém vývojovém stupni rostliny a vnějších podmínkách. (2)

Některé přírodní látky nelze získat v dostatečném množství izolací z rostlin nebo biosyntézou, která je náročná ekonomicky. Proto je zkoumána metoda pěstování rostlin *in vitro*. Nevýhoda je v tom, že rostliny pěstované *in vitro* produkují méně sekundárních metabolitů v porovnání s rostlinami pěstovanými v přírodě. Například produkce silymarinu v buněčných kulturách je velmi nízká 0,05–0,4 % suché hmotnosti v porovnání s izolací z plodů této rostliny 1-3 %. (3) Hledají se proto různé způsoby, jak tuto produkci zvýšit.

Jednou z neefektivnějších metod pro zdokonalení syntézy sekundárních látek u rostlin je metoda elicítace. Elicítace je proces, který dokáže indukovat nebo zvýšit syntézu sekundárních metabolitů. Přišlo se na to, že sekundární metabolity jsou produkovány v závislosti na obranné reakci, která je spuštěna pomocí elicitoru. Pro úspěšnou elicítaci je však nutné použít co nejvhodnější elicitor o optimální koncentraci pro daný druh rostliny a určit optimální dobu jeho působení. Tato metoda je v současné době velkým záměrem výzkumu a stala se již v řadě vyspělých zemí nedílnou součástí zemědělské produkce rostlin. (4)

Pro tuto práci byla zkoumána elicítace rostliny *Silybum marianum*, která je velice významná pro farmaceutické uplatnění. Obsahuje unikátní komplex flavonolignanů, silymarin, který je nenahraditelnou hepatoprotektivní látkou. Účinky této rostliny mají však mnohem širší spektrum uplatnění a výzkum stále pátrá po dalším vlivu na pochody v organismu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je seznámit se s metodou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále zjistit vliv seleničitých iontů jako abiotického elicitoru na produkci jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v kalusové a suspenzní kultuře odvozené z rostliny *Silybum marianum* L. Na základě stanovení obsahu těchto sekundárních metabolitů HPLC metodou zjistit, zda seleničité ionty v různých koncentracích jsou schopny ovlivnit produkci obsahových látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*)

3.1.1 Charakteristika



Ostropestřec mariánský je jedno až dvouletý statný bodlák. Patří do čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*). Lodyha je dole hustě, nahoře řidce listnatá a dorůstá výšky 1 m. Listy jsou střídavé, objímavé, tuhé a na žilnatině bíle mramorované. Z vejčité, ostnatě zubaté báze vyrůstá nachový květ. Plodem jsou lesklé, hnědě skvrnitě nažky s bílým chmýrem. (5)

Tato statná bodlákovitá rostlina má silnou větvenou lodyhu s chobotnatě vykrajovanými, ostře zubatými listy, které jsou tuhé, světlé, lesklé a na líci často bílé skvrnitě. Velké květní úbory spočívají jednotlivě na konci lodyhy a jejich větvích. Lůžko úboru je štětinkaté a odstálé. Zákrovní listy mají dlouhé trny. Hermafroditní květy jsou červenofialové. Plody mají chmýří složené z chloupků. Kvetे od července do září. (6) (7)

Obrázek 1 Ostropestřec mariánský (8)

Pokud je to rostlina dvouletá, vypučí na jaře trsem bodlinatých listů s výraznými bílými žilkami. Po červnu se na lodyhách vysokých asi 1 m objevují purpurově červené květy. Na konci léta se z květů vyvinou plody, které se sklízí. (9)

3.1.2 Výskyt

Tato rostlina je původem ze Středomoří. Dává přednost útesům na pobřeží Atlantského oceánu ve Francii a na jihu Anglie, ale najdeme ho i na mnoha místech ve vnitrozemí, téměř vždy na slunečném stanovišti. U nás se pěstuje velkoplošně jako plodina používaná pro farmaceutické účely a patří mezi čtveřici nejvýznamnějších velkoplošně pěstovaných bylin. Někdy roste divoce na rumišťích a kamenitých stráních. Roste na hlinitých a písčitohlinitých, na živiny bohatých půdách. (9) (7)

3.1.3 Historie

Ostropestřec mariánský slouží už tisíce let jako bylinný lék. Původně lidé věřili, že pomáhá při produkci mateřského mléka. Podle tradice byly typické bílé části na žilkách listů pozůstatkem mléka Panny Marie.

Jeho použití při jaterních obtížích sahá do starověkých řecko-římských dob. Plinius Starší (23–79 n.l.) tvrdil, že mléčná šťáva této rostliny je výborným prostředkem upravující žluč. Anglický bylinář John Gerald, žijící v 16. století, ji doporučoval na zahnání trudnomyslnosti, stavu, který byl v té době spojován s jaterním onemocněním.

V 19. století němečtí lékaři léčili extraktem z této byliny žloutenku a další onemocnění jater. V roce 1949 doložil podpůrný německý výzkum, že ochraňuje játra zvířat, která byla vystavena vysokým dávkám silného jaterního toxinu. V roce 1968 byla pak v semenech objevena složka silymarin a používá se v Evropě při léčbě všemožných druhů jaterních poruch. (6)

3.1.4 Pěstování Ostropestřce mariánského v domácích podmínkách



Ostropestřec je v našich podmínkách jednoletkou. Výsev se provádí na jaře (v dubnu) hustě do řádků vzdálených cca 50 cm. Po vzejití se rostliny jednotlivě v řádku na cca 30 cm. Dorůstá výšky 1–2 metrů.

Obrázek 2 Sazenice *Silybum marianum* (10)



První, co ze země vyraší, jsou drobné mladé lístky, které se rychle vyvinou v růžici zelených pichlavých listů s bílými skvrnami. Listová růžice se nějaký čas drží při zemi a rozrůstá se jen do šířky. Objevují se nové listy, staré mohutní a sílí jim trny.

Obrázek 3 Detail bíle skvrnitých listů (10)



Obrázek 4 Vzrostlá rostlina v květu (10)

V určité fázi se z listové růžice začínou zvedat stvoly, na jejichž koncích ční ostnitá poupata, která se časem rozvinou ve fialové květy.



Obrázek 5 Detail květu (10)



Obrázek 6 Bílé chmýří (10)



Obrázek 7 Mláčení okřídlených semen (10)

Bílé chmýří signalizuje nejvyšší čas sklizně. Těsně před zralostí se celé chmýřité hlavičky uřežou a uloží na větraných, suchých místech, kde dozrávají. Teprve potom se šištice vymlátí a plody zbaví chmýru. (10)

Lidově se dosud hodně užívá i list, trhaný na jaře v květnu a červnu, mezi 14. a 16. hodinou. Zřídka se užívá i kořen, kopaný na jaře. (5)

3.1.5 *Silybum marianum* jako lékopisná droga

Plod ostropestřce mariánského, *Silybi mariani fructus*, je lékopisnou drogou. Je definován jako chmýru zbavený zralý plod druhu *Silybum marianum* (L.) Gaertn. a musí obsahovat minimálně 1,5 % silymarinu vyjádřeného jako silybinin. Droga nesmí mít žluklý pach.

Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum, suchý, čištěný a standardizovaný extrakt vyrobený z plodů ostropestřce mariánského s obsahem 90–110 % silymarinu vyjádřeného jako silybinin, je žlutohnědý amorfni prášek, který se vyrábí z rostlinné drogy vhodným postupem za použití vhodného rozpouštědla. (11)

3.1.6 Použití

Silymarin je hlavním představitelem skupiny léčiv označovaných jako hepatoprotektiva. Pokusy na zvířatech prokázaly jeho příznivý účinek. Pokud byl podáván profylakticky, zmírnil poškození hepatocytů hepatotoxickými látkami a redukoval riziko přechodu postižení do chronického stádia. Terapeutická účinnost silymarinu u již vzniklého, především chronického poškození jater nebyla dosud kontrolovanými klinickými studiemi jednoznačně prokázána. Příznivý účinek silymarinu (respektive jednoho z flavonolignanů v něm obsažených, silybininu) byl opakovaně potvrzen při léčbě pacientů intoxikovaných muchomůrkou zelenou *Amanita phalloides*. U pacientů s alkoholovou hepatopatií (ve stádiu jaterní cirhózy) vedlo podávání silymarinu v jedné kontrolované klinické studii ke zlepšení funkce jater a ke snížení morbidity.

Indikován je tedy jako pomocné léčivo u chronické aktivní a perzistující hepatitidy, u toxických nebo metabolických lézí jater a polékového poškození jater. Je doporučován např. u chronických forem žloutenky, při poškození jater alkoholem, při onemocnění žlučníku či jako prevence účinku toxických látek na játra. (12)

Ostropestřec také snižuje hladinu cholesterolu. Jedna ze složek, silybin, snižuje oxidaci tuků. Účinné látky obsažené v silymarinovém komplexu napomáhají rovněž při optimalizaci hladiny lipidů v krvi. Celkový cholesterol nebývá ovlivněn, ale užíváním přípravku přípravků se silymarinem stoupá hladina HDL na úkor LDL, který je na HDL přeměňován. Výsledkem je ochrana cév a srdce před aterosklerózou. (6) (13)

Dále snižuje odolnost vůči inzulinu u jedinců trpících cukrovkou 2. typu, kteří mají zároveň cirhózu. Také může omezit růst nádorových buněk při rakovině prsu, děložního čípku, prostaty a dalších druzích rakoviny. Může také pomoci při lupénce. Stále probíhají výzkumy týkající se využití byliny při chronické hepatitidě typu C a jaterních onemocnění objevujících se u lidí, kteří pijí jen málo alkoholu nebo nepijí vůbec. (6)

Ostropestřec mariánský se také rozsáhle zkoumá kvůli možným účinkům jako doplňková léčba při a po chemoterapii. Je možné, že by se dal využít také pro zmírnění dlouhodobých dopadů léčby rakoviny na játra a kardiovaskulární systém, jako preventivní prostředek proti rakovině a při odstraňování komplikací, které postihují pacienty s HIV. (6)

3.1.7 Mechanismus účinku silymarinu

Mechanismus účinku silymarinu spočívá v omezení transportu některých toxických látek (např. faloidinu) do jaterní buňky, v příznivém ovlivnění zánětlivé reakce ve tkáni, ve snížení aktivit neutrofilů a v inaktivaci volných kyslíkových radikálů. Silymarin dále vede ke zlepšení metabolismu jaterní buňky, stabilizaci buněčných membrán (hepatoprotektivní působení) a ke snížení tvorby vaziva. (12) Silymarin chrání extraplazmatické a endoplazmatické membrány hepatocytů proti působení hepatotoxických látek a zlepšuje funkci jater. Za podstatu membrány stabilizujícího účinku silymarinu se považuje jeho antioxidační působení a inhibice lipoperoxidace přímou inhibicí lipooxygenázy. Silymarin jako zhášec (scavenger) volných radikálů se může uplatnit i při radiačním poškození jater. Kromě hepatoprotektivního účinku se předpokládá i účinek imunomodulační, který alespoň z části může souviset s antioxidačním působením, inhibicí aktivity lipooxygenázy, resp. ovlivněním syntézy prostanoidů. (14)

3.1.8 Formy užívání

Semena ostropestřce se mohou konzumovat v syrovém stavu. Právě v semenech se nachází nejvíce účinných látek. Semena je vhodné jíst při každém jídle. Slupky semen jsou navíc výborným zdrojem vlákniny a pomáhají s čištěním trávicího systému.

Dalším oblíbeným způsobem užívání je příprava čaje. Jelikož se obsažená látka silymarin špatně vyluhuje ve vodě, je nutné plody ostropestřce důkladně rozdrtit nebo připravit čaj přímo ze semen (1–2 čajových lžiček) a 15 min nechat přejít varem. Čaj lze scedit nebo konzumovat i se semeny. Čaj z ostropestřce se pije během jídla nebo co nejdříve po jídle.

Olej z ostropestřce mariánského lze přímo konzumovat nebo použít na vaření a do salátů. V oleji, který je lisovaný za studena, jsou zachovány všechny vitamíny a minerály. Olej navíc přispívá ke snadnějšímu trávení zeleniny a ke vstřebání vitamínů A, D, E, K. (15)

Plod je také součástí jaterních čajovin. Drogu je možno podávat samostatně, ale i v kombinacích především s řepíkem, pampeliškou, čekankou, zemědýmem, třezalkou, oddenkem pýru, meduňkou, vlašovičником a benediktem. (5)

Ostropestřec mariánský se může také užívat v podobě tinktury. (15)

Další možnou formou je prášek z mletých plodů ve směsi s mléčným cukrem v poměru 1:2, v dávce 2–4 čajové lžičky denně. Prášek musí být skladován ve vzduchotěsně uzavřené nádobě, v suchém a poměrně chladném prostředí. Připravuje se jen takové množství prášku, které spotřebujeme během několika málo dnů. Mleté plody totiž poměrně rychle žluknou a pak působí spíše opačně. (15)

Na výrobu homeopatické tinktury se semena ostropestřce mariánského zpracovávají dvojím způsobem, a to buď celá nebo mletá či drcená. Obě receptury zachovávají maximální množství účinných látek, které jsou obsaženy zejména ve slupce. Odzkoušeno je následující homeopatické zpracování: Do 0,5 litru vody se přidá 45 g dobře zralých, černých semen a vše se pomalu vaří přikryté, až zůstane 250–300 ml odvaru. Odvar se slije a pak se přidá 250 ml lihu 90%. Vzniklou tinkturu ředíme na potenci D4 lihem 40%. Obecně ji užíváme v potenci D3 nebo D4 s dávkováním 3krát denně 10 kapek po jídle. Její hlavní využití je zejména ve směsi s vlaštovičником a benediktem lékařským. Tato směs však nemá co do množství jednotlivých bylin stabilní složení. Užívá se při potížích s játry, žlučníkem, žlučovody a žaludkem. Může se aplikovat i při gynekologických a plicních potížích nebo žloutence. (5)

Z registrovaných přípravků v ČR mohou jmenovat:

- **Simepar** (Silymarinum 70 mg, Cyanocobalaminum 1,2 µg, Thiamini hydrochloridum 4mg, Riboflavinum 4 mg, Nicotinamidum 12 mg, Pyridoxini hydrochloridum 4 mg, Calcii panthothenas 8 mg v 1 tvrdé tobolce)
- **Silymarin AL 50**- Silymarinum 50 mg v 1 tbl
- **Legalon 140** – Silymarinum 140 mg v 1 tbl
- **Legalon 70** – Silymarinum 70 mg v 1 tbl
- **Lagosa 150** – Silymarinum 150 mg v 1 tbl
- **Flavobion** – Silymarinum 70 mg v 1 tbl (16)

Tablety se za účelem zvýšení absorpce silymarinu užívají po jídle. Aby dosáhla terapie dostatečného účinku, měla by být dlouhodobá od 3 měsíců po 1 rok. (14) Počáteční dávka pro dospělé je 140 mg třikrát denně (300–450 mg sil/den), udržovací 200-300 mg denně ve 2–3 dílčích dávkách. (12)

Látka podléhá enterohepatální cirkulaci, která také vysvětluje prodloužené projektivní působení na hepatocyty. (13)

Po perorálním podání se nalézají v krvi jen nízké koncentrace jeho hlavní komponenty silybininu, ve žluči se však nalézají asi 20–40 % aplikované dávky. Renální vylučování je nepatrné, za 24 h po aplikaci se objeví v moči jen asi 1–7 % aplikované dávky. Silybinin se vylučuje převážně (více než 80 % vstřebeného množství) žlučí a to především v konjugované formě. Silybinin se po dekonjugaci neabsorbuje a dochází k enterohepatálnímu oběhu. Poločas biliární eliminace je asi 3–4 hodiny. Silybinin se neakumuluje. Při opakovaném podání 140 mg 3krát denně se dosáhne ustáleného stavu biliární eliminace. (14)

3.1.9 Kontraindikace, nežádoucí účinky, interakce

Může vyvolat alergickou reakci u osob alergických na rostliny z této čeledi. Má jen výjimečně vedlejší účinky laxativní, nevolnost, mírné gastrointestinální podráždění, bolest hlavy. (6) Přípravek se nepodává dětem mladším než 5 let. (14) Těhotné a kojící ženy a osoby s onemocněními, která vyžadují hormonální léčbu by měly ostropestřec užívat s opatrností. Užívání může také narušit účinek orálních kontraceptiv. Muži s rakovinou prostaty by měli ostropestřec užívat pouze po poradě s lékařem. Může dojít ke snížení potřeby inzulínu u diabetiků s alkoholickou cirhózou jater. (6)

3.1.10 Obsahové látky

Aktivní komponentou rostliny je silymarin. Je to standardizovaný extrakt získaný ze semen *Silybum marianum* obsahující přibližně 70–80 % silymarinového komplexu (jednotlivých flavanolignanů) a 20–30 % chemicky nedefinované frakce zahrnující hlavně polymerované a oxidované polyfenoly. (17)

Hlavní komponenty silymarinu jsou silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin A, silychristin B a silydianin. Těchto 6 sloučenin existuje jako ekvimolární směs transdiastereisomerů.

Silybin je považován za hlavní a nejvíce aktivní komponentu v silymarinovém komplexu. Chemická struktura byla identifikována roku 1975 použitím degradačních metod. Je směsí dvou diastereoizomerů A a B v poměru přibližně 1:1.

Množství jiných chemicky příbuzných sloučenin bylo nalezeno v semenech jako dehydrosilybin, desoxysilychristin, desoxysilydianin, silandrin, silybinom, silyhermin a neosilymermin. Stejným znakem těchto látek je flavanolignanový skelet, kde je taxifolin spojen s konyferylalkoholem přes oxeranový kruh. Dále obsahuje několik flavonoidů jako např. taxifolin, který má největší zastoupení, apigenin a jeho 7-O-glukosid.

Mezi další obsahové látky této drogy patří olej s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin, steroly (betasitosterol, kampesterol), aminokyseliny se značným podílem zástupců obsahujících síru, cukry (glukóza, fruktóza a blíže neurčená pentóza), hořčiny, silice. 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. (4) (5) (13) (17)

Bíle kvetoucí varieta *Silybum marianum* navíc obsahuje 3-deoxyflavanolignany silandrin, silymonin, silyhermin a neosilyhermin A a B. (17)

3.1.11 Biosyntéza flavonolignanů a jejich chemická struktura

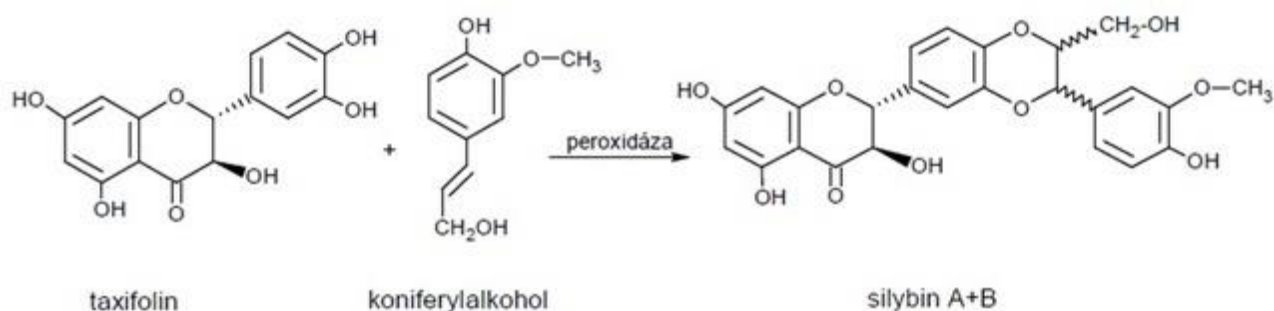
Silymarinový komplex se získává pomocí extrakce přímo z rostliny nebo explantátové kultury. Extrakt se získává ze semen lisovaných za studena a lisovaný zbytek je poté extrahován ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt je odpařen a zpracován.

Silymarinový komplex jde také připravit biosynteticky. Taxifolin a koniferylalkohol jsou základními reakčními složkami biosyntézy silymarinového komplexu. Toho jde využít ke zvyšování produkce silymarinu u explantátových kultur přidáním koniferylalkoholu vázaného např. na cyklodextrin do živného média.

Jednotlivé flavonolignany lze tedy biosyntetizovat oxidační reakcí taxifolinu a koniferylalkoholu za katalýzy enzymu peroxidázy. Reakce není stereospecifická, vzniká ekvimolární směs diastereomerů silybinu A a silybinu B a další flavonolignany. Tento způsob biosyntézy je však náročný, proto se v praxi nevyužívá.

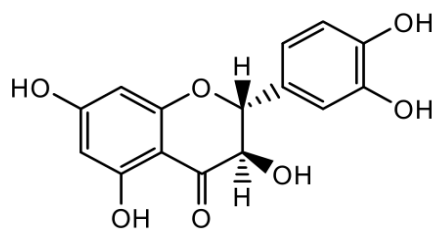
Flavonolignanové jádro se skládá dihydroflavanolu taxifolinu, který je spojený ke koniferylalkoholu skrz oxeranový kruh. Oxeranový kruh je zodpovědný za biologickou aktivitu silymarinu a otevření tohoto kruhu by znamenalo ztrátu účinnosti. Isosilybin a silybin obsahují ve své struktuře 1,4-dioxanový kruh. Silydianin má složitější strukturu vzniklou intramolekulární cyklizací.

Kvůli špatné rozpustnosti ve vodě a nízké biodostupnosti je silymarin dáván do komplexu s fosfatidylcholinem, β -cyklodextrinem nebo dokonce jako glykosid, který má lepší rozpustnost a vyšší aktivitu. (17) (18)

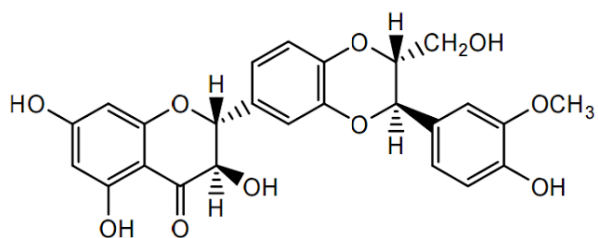


Obrázek 8 Biosyntéza flavonolignanů (19)

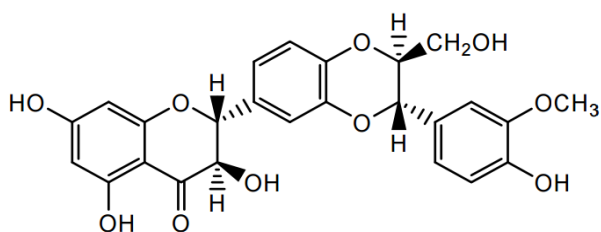
Obrázek 9 Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu (20)



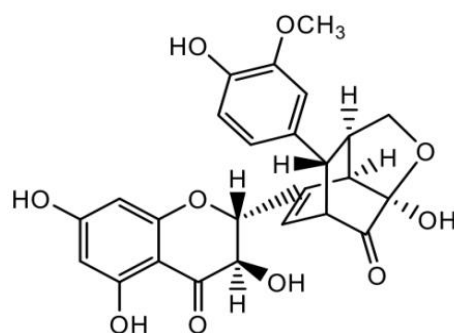
Taxifolin



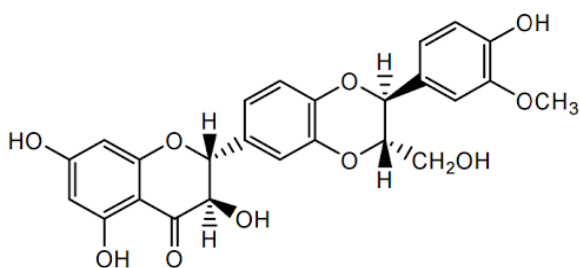
Silybin A



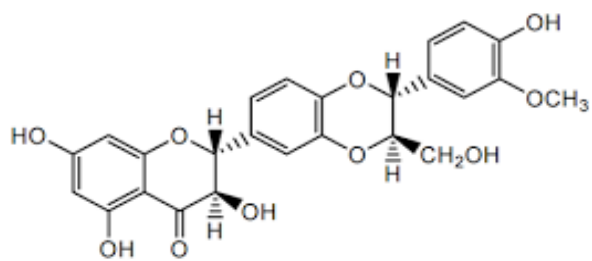
Silybin B



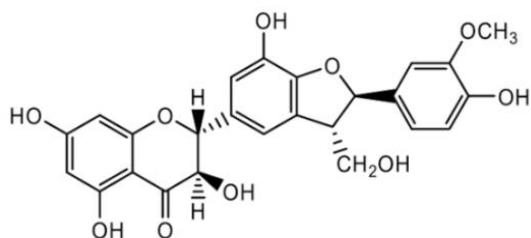
Syldianin



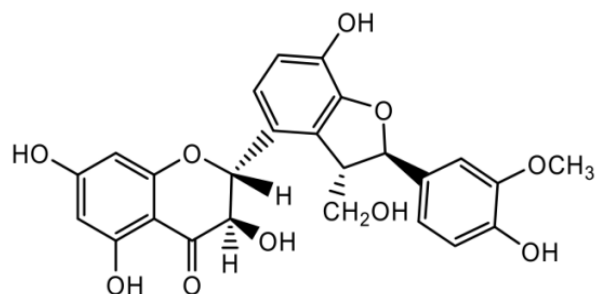
Isosilybin B



Isosilybin A



Silychristin



Isosilychristin

3.2 Kultivace rostlin *in vitro*

Jedná se o metodu pěstování rostlinného materiálu na živných médiích za sterilních podmínek.

3.2.1 Základní podmínky kultivace *in vitro* (21)

- a) Aseptická kultura – nutnost sterilizace živných médií, použitých nástrojů, pracovního prostoru a desinfekce rostlinného materiálu
- b) Přiměřená výživa explantátu – vhodné složení živného média
- c) Vhodné fyzikální podmínky
 - osvětlení – dostatečná intenzita a vhodné spektrální složení
 - teplota – nutnost řízené klimatizace
 - koncentrace plynů – správná ventilace kultivačních nádob
 - vlhkost vzduchu

Na rozdíl od živočichů jsou rostlinné buňky schopny nepohlavního vegetativního rozmnožování. Díky tomu jsou schopny izolované části těla rostliny narůst za určitých podmínek kultivace. Jde z nich dokonce vypěstovat i intaktní rostlinu. Takové množení *in vitro* se nazývá mikropropagace. Rostliny tuto schopnost mají díky totipotenci, což je vlastnost unikátní pro rostlinnou říši. (22)

3.2.2 Vysvětlení pojmů

EX PLANTARE = pěstovat mimo

Explantát = každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo soubor orgánů, který je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách

In vitro = ve skle, to znamená v umělých podmínkách

Aseptická kultura = kultura bez infekce (bakterie, kvasinky, plísně)

Axenická kultura = kultura jednoho organismu

Tkáňová kultura = historický termín přenesený z oblasti fyziologie živočichů, není správný pro kultury rostlinných pletiv

Totipotence buňky = schopnost somatické buňky regenerovat za vhodných podmínek celou rostlinu

Meristém = dělivé pletivo

Regenerace *de novo* = regenerace rostlinných orgánů (prýtů, kořenů nebo květů) z buněk diferencovaných pletiv (21)

Ve svém principu zahrnují rostlinné explantátové kultury izolaci buněk, pletiv, orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí (definovaná kultivační média, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla). (22)

Explantátová kultura se získá z kterékoli části rostliny (nadzemní, podzemní) explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na živnou půdu a inkubací v teplotním rozmezí 23–28 °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. (23)

V těchto podmínkách mohou být kultivovány kompletní rostliny, embrya v různých fázích vývoje, organizované části rostliny (jednotlivé orgány nebo pletiva), neorganizovaná pletiva (kalusy), shluky buněk, jednotlivé buňky a za určitých podmínek i protoplasty. (22)

Kultury můžeme rozdělit do skupin dle mnoha faktorů, například podle jejich původu na kultury izolovaných semen či embryí, kultury orgánové, kalusové, buněčné či protoplastové. Pro naši experimentální práci byly využívány kultury kalusové a suspenzní.

Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk. U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd. U jednoděložných rostlin je výběr pletiv vhodných k odvození kalusu menší. Je možné použití embrya, velmi mladé listy, nodální segmenty stonků, popř. květní základy. Ještě problematičtější je odvození kalusu u dřevin. (1)

3.2.3 Výhody a nevýhody explantátových kultur

Explantátové kultury mohou nabídnout alternativní a obnovitelný zdroj sekundárních metabolitů, možnost vést proces za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. Výsledkem jsou po kvalitativní stránce homogenní produkty, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur. Hlavní výhodou je možnost dlouhodobé kultivace velké populace buněk v poměrně malém prostoru a z každé populace buněk je možné vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Je tu možnost získávat produkty obsažené v nesnadno pěstovaných rostlinách nebo nové látky v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk. (23)

Nevýhodou explantátových kultur je jejich nízká produkce sekundárních metabolitů v porovnání s intaktní rostlinou. Někdy může být až nedetekovatelná nebo produkce metabolitů vymizí úplně. Cílem bádání je dosáhnout takových koncentrací metabolitů, aby byly dostatečné pro komerční výrobu. Postupy zahrnují změny ve složení média, zacházení s elicitory, fytohormony podporujícími růst, přidání prekurzorů do média a jiné podobné postupy. (18) (23)

3.2.4 Využití kultivace *in vitro*

Kultivace rostlin *in vitro* je interdisciplinární metoda, jejíž používání může sloužit k nejrůznějším záměrům. Je používána v praxi především k vegetativnímu množení rostlin (mikropropagaci). Vhodnými postupy lze v krátkém čase nezávisle na ročním období získat značný počet nových, avšak malých jedinců, jejichž vlastnosti jsou stejné jako vlastnosti rodičovské rostliny.

Dalším častým záměrem kultivace *in vitro* je ozdravení materiálu. Regenerací z meristémů a použitím vhodných kultivačních podmínek (teplotních změn, aplikací antibiotik nebo virostatik) lze zbavit materiálu virů nebo jiných patogenů. Kultivace fragmentů pletiv, buněk nebo protoplastů *in vitro* je nezbytná pro genové manipulace a transformace rostlin. Regenerace jedinců z mikrospor umožňuje získat haploidní jedince a jejich diploidizací homozygotní jedince, materiál cenný pro šlechtitele. Podmínky *in vitro* umožňují studovat řadu fyziologických procesů, např. regulaci embryogeneze nebo dormance, mykorrhizu nebo produkci sekundárních metabolitů. (22)

Z explantátových kultur je izolována řada farmaceuticky důležitých látek jako např.:

- ajmalicin jako vasodilatans, vinkristin jako antileukemikum z kultury z *Catharanthus roseus*
- reserpin jako antihypertenzivum z *Rauwolfia* sp.
- kofein jako stimulans a kardiotonikum z *Camelia sinensis* a *Coffea arabica*
- morfin a kodein jako analgetikum z *Papaver somniferum*
- chinin jako antimalarikum z *Cinchona ledgeriana*
- ginseenosidy jako adjuvans a tonikum z *Panax ginseng*
- ubichinon-10 jako kardiotonikum z *Nicotiana tabacum*
- visnagin jako kardiotonikum z *Ammi visnaga*

V některých explantátových kulturách se dosáhlo vyššího obsahu příslušné látky ve srovnání s matečnou rostlinou (23)

3.2.5 Kultivační média pro explantátové kultury

Kultivační médium musí vždy obsahovat vodu a všechny esenciální minerální prvky. Dle charakteru explantátu a podmínek kultivace *in vitro* (na světle, ve tmě) je médium doplňováno sacharidy, vitamíny, aminokyselinami a dalšími složkami.

Médium může být zpevněno agarem, explantát může být kultivován v tekutém médiu provzdušňovaném pohybem nebo na porézním materiálu, po němž médium vzlíná. Dle záměru a cíle kultivace může obsahovat růstové látky nebo jejich směsi. Aktivaci vývoje dormančních pupenů a zakládání pupenů *de novo* pozitivně ovlivňují cytokiny, na vzniku adventivních kořenů se podílejí auxiny. Gibereliny podporují růst založených orgánů, kyselina abscisová navozuje zpomalení jejich růstu a útlum jejich vývoje. (22)

Úspěch buněčných kultur závisí na mnoha faktorech – původu explantátu a kultivačním médiu. Obecně tkáně z kořínků sazenic, z nedormantních pupenů nebo z kořenové čepičky jsou nejlepším materiálem pro produkci kalusu. (24) Složení média je determinující faktor pro růst. Média navržená Whitem obsahují živiny normálně potřebné rostlinnými buňkami a jsou široce používány zejména pro kořenové kultury. Nicméně od té doby bylo zjištěno, že množství dusíku a draslíku je nedostatečné pro maximální růst kalusu a buněčné suspenze. Potřeba pro bohatší minerální směs byla kompenzována přidáním kvasnicového extraktu, hydrolyzátu proteinu, aminokyselinami, kokosovým mlékem nebo jinými organickými doplňky.

Úspěch rostlinných kultur závisí na výběru kultivačního média. Buňky mnoha rostlinných odrůd mohou růst pouze na konkrétně definovaném médiu. Široké použití Murashigeho Skoogova média bylo navrženo pro buňky tabáku, je používáno rozšířeně a s úspěchem pro kultivaci kalusu na agaru, pro buněčnou suspenzi v tekutém médiu i k účelu morfogenetických studií. Médium obsahuje správné množství a podíl organických živin, které uspokojuje nutriční a fyziologické potřeby mnoha rostlinných buněk v kultuře. (24)

Média rostlinných kultur by měla obsahovat některé nebo všechny z následujících složek: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo jiné zdroje dusíku, zdroj uhlíku, nedefinované organické doplňky, růstové regulátory a tuhnoucí složky. Dle Mezinárodní asociace pro fyziologii rostlin, prvky v koncentracích vyšších než 0,5 mM/l jsou považovány za makroelementy, naopak složky, které jsou v koncentraci nižší než 0,5 mM/l jsou definovány jako mikroelementy. (25)

Makroelementy

Jedná se o nejhojněji zastoupené prvky. Přidávají se oproti ostatním složkám do média ve vysoké koncentraci. Řadí se mezi ně dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra.

Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu.

Kultivační médium by mělo obsahovat přinejmenším 25–60 mM anorganického dusíku. Rostlinné buňky mohou růst na médiu obsahujícím dusík pouze v nitrátové formě, ale mnohem lepšího růstu je dosaženo, je-li dusík do média dodáván společně v nitrátové formě a ve formě amonných solí. Redukovaný dusík se může do média dodávat také ve formě organických sloučenin (aminokyselin).

Nitráty se obvykle dodávají do média v koncentraci 25–40 mM, amonium se dodává v koncentraci 2–20 mM. Dusík se dodává ve formě dusičnanu draselného a dusičnanu amonného. Draslík se do médií dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu v koncentraci 20–30 mM. Optimální koncentrace fosforu, hořčíku a síry a vápníku se pohybuje v rozsahu 1–3 mM. (1)

Mikroelementy

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst tkáňových kultur patří Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo. Železo je nejpodstatnějším prvkem ze všech mikroelementů, kvůli špatné rozpustnosti se nejčastěji používá ve formě chelátu s etylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA). Zinek se také do médií dodává v chelátové formě. Do médií se někdy taky dodává Co, I, Na, Cl, ale tyto prvky nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné. Měď a kobalt se obvykle dodávají do médií v koncentraci 0,1 μM , železo 1 μM , molybden v koncentraci 1 μM , jód 5 μM , zinek 5–30 μM , mangan 20–90 μM a bór 25–100 μM . (1) (25)

Zdroj uhlíku

Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza, je možno ji nahradit i glukózou či fruktózou. V kultivačních médiích byly testovány i jiné sacharidy jako laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza a škrob, ale většinou byly méně efektivní než sacharóza a glukóza. Obvykle používaná koncentrace sacharózy v médiu jsou 2–3 %. Sacharóza přítomná v médiu může být rozštěpena na glukózu a fruktózu. K částečné hydrolýze dochází také při autoklávování média. Sacharóza působí jako morfogenetický spouštěč při tvorbě axilárních pupenů a větvení přídatných kořenů. (1)(25)

Přidání melasy z cukrové třtiny, banánového extraktu nebo kokosového mléka do základního média může být dobrou alternativou pro snížení nákladů na médium a tyto substráty navíc kromě cukru jsou zdrojem vitamínů a anorganických iontů požadovaných pro růst. (25)

Vitamíny

Normální rostlina si sama syntetizuje vitamíny nezbytné k jejímu růstu. Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin, myo-inositol. Thiamin je pro růst tkáňových kultur nepostradatelný, kyselina nikotinová a pyridoxin se také velmi často dodávají, ale jejich přítomnost v kultivačním médiu není tak nezbytná. (1) Myo-inositol se vyskytuje ve většině živných médií. Jedná se o sacharid, který je přidáván do médií v malém množství ke stimulaci růstu většiny rostlinných druhů. Předpokládá se jeho účast na tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které hrají roli v buněčném dělení. V kultivačních médiích se někdy používají další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin, ačkoliv nejsou limitujícím faktorem pro růst kultur. (1)

Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku

Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých aminokyselin v živném médiu stimulovat růst explantátů. Aminokyseliny se dodávají do živných médií především v případě kultivace buněk nebo protoplastů. Aminokyseliny poskytují rostlinným buňkám zdroj dusíku, který je snadněji asimilován než anorganické zdroje nebo jsou využívány přímo k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin (kasein hydrolyzát, L-glutamin, L-asparagin, adenin). (1)(25)

Ostatní organické složky

Růst explantátové kultury je možno stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosové mléko, kvasniční extrakt, sladový extrakt, extrakt z banánů, pomerančová či rajčatová šťáva. (1)

Do médií se také někdy dodává aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Aktivnímu uhlí se připisují 3 základní funkce v živném médiu: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média. Stimulační účinek aktivního uhlí na růst explantátů je připisován jeho schopnosti vázat toxické fenolické sloučeniny produkované rostoucím explantátem. Aktivní uhlí se používá v koncentraci 0,5–1,0 %. Růst a diferenciací byla stimulována aktivním uhlím u orchidejí, cibule, mrkve a rajčat, naopak negativní vliv na buněčný růst měla u sojových bobů. Aktivní uhlí přidané do média v koncentraci 1 % značně zvýšilo hydrolýzu sacharózy během autoklávování a způsobilo okyselení média. (1)(25)

Látky používané pro zpevnění média

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Má totiž oproti jiným gelotvorným látkám řadu výhod. Za prvé, je-li agar smíchan s vodou, dojde k vytvoření gelu při teplotě 60–100 °C, který tuhne při 45 °C. Je tedy stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost je možno regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. Používá se obvykle v koncentraci 0,8–1,0 %. Důležitá je čistota používaného agaru, jelikož obsahuje vápník, hořčík, draslík a sodík, tudíž změna koncentrace agaru v médiu může změnit i koncentraci některých prvků v živném médiu nebo vitamínů. (1)

Vedle agaru lze používat ke zpevnění média agarózu, což je syntetická látka. Rychle tuhne a výsledný gel je velmi čistý. (25)

V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pění, čedičové vatě, perforovaném celofánu nebo plastových nosičích, do kterých se ukotvuje polypropylenová membrána. (1)

Růstové regulátory

Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. O charakteru růstu explantátové kultury nerozhoduje pouze koncentrace jednotlivých hormonů, ale často jejich vzájemný poměr. To platí především pro auxin a cytokinin, který určuje typ a míru organogeneze v rostlinných buněčných kulturách. Poměr závisí na druhu rostliny, kultivaru a explantátu. (1)

Auxiny

Mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftyloctová (NAA). IAA představuje jediný přírodní auxin, který se vyskytuje běžně v rostlinných tkáních, ostatní jsou látky syntetické. Mezi další syntetické auxiny patří kyselina chlorfenoxyoctová (4-CPA), 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina (2,4,5-T), 3,6-dichlor-2-metoxybenzoová kyselina (dicamba) a 4-amino-3,5,6-pikolinová kyselina (picrolam). (3) (25)

Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolizovány. Dle ohybového testu je 2,4-D 8–12krát aktivnější než IAA; 2,4,5-T 4krát; PCPA a picrolam 2–4 krát a NAA dvakrát účinnější. (1)

Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci prýtů a kořenů. (1)

Cytokininy

Mezi cytokininy běžně používané v kultivačních médiích patří především benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (IPA), furfurylaminopurin (kinetin) a zeatin. Zeatin a 2iP jsou považovány za nativní cytokininy, zatímco kinetin a BAP představují syntetické cytokininy. Adenin, další nativně vyskytující se látka, má podobnou chemickou strukturu jako cytokininy a v některých případech také vykazuje cytokininovou aktivitu. Cytokininy se používají v kultivačních médiích za účelem stimulace buněčného dělení a stimulace tvorby axilárních prýtů.

Morfogenetická reakce v explantátové kultuře je značně závislá na vzájemném poměru auxinu a cytokininu v kultivačním médiu. Iniciace tvorby kořenů, embryogeneze, iniciace tvorby kalusu je stimulována, je-li poměr auxinu k cytokininu vysoký. Je-li tento poměr nízký je indukována tvorba adventivních či axilárních prýtů. (1)(25)

Gibereliny

Gibereliny zahrnují více než 20 sloučenin, ovšem GA₃ (kyselina giberelová) je nejčastěji používaná. Většina explantátů jejich přítomnost pro svůj růst v médiu nevyžaduje, přidávají se většinou do média za účelem stimulace růstu buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, ke stimulaci růstu kalusu a ke stimulaci růstu zakrslých rostlinek.

Kyselina abscisová

Kyselina abscisová se dodává za účelem stimulace i inhibice růstu kalusu (v závislosti na rostlinném druhu), ke stimulaci proliferace prýtů a k inhibici pozdějších fází embryogeneze.

Ačkoliv rostlinné regulátory jsou nejdražšími složkami kultivačního média, mají malý vliv na finanční náklady média, protože jsou používány pouze ve velmi malých koncentracích. (1)(25)

Sterilizace médií

Média používaná pro rostlinné explantátové kultury musí být vysterilizovaná. Ke sterilizaci se používá autoklávování při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa. Doba sterilizace je závislá na objemu sterilizovaného média v jednotlivých nádobách. Většinou se využívá rozlití médií do více menších nádob a používá se tím pádem kratší doba sterilizace, než sterilizovat větší objemy po delší dobu. Řada složek médií je totiž termolabilní a při delší době sterilizace je větší pravděpodobnost jejich rozkladu.

Některé složky médií jsou však termolabilní a není možné je sterilizovat autoklávováním. Mezi termolabilní komponenty živných médií patří fruktóza, glukóza, kalcium pantotenát, gibereliny, riboflavin, kyselina listová, močovina, asparagin, adenin sulfát, IAA a enzymy používané k izolaci protoplastů. Zásobní roztoky těchto látek se sterilizují filtrací a ve sterilním prostředí se pipetují sterilní pipetou do média, které se

ochladilo na 45–50 °C. Ke sterilizaci se používají membránové filtry o velikosti pórů 0,22 µm.
(1)

Ve všech případech je třeba při zhotovení živného média věnovat pozornost koncentraci vodíkových iontů. Obvykle se doporučuje pH 5,5–6,0 v některých případech 6,0–7,0. Příslušná hodnota pH se v případě potřeby upraví hydroxidem draselným nebo kyselinou chlorovodíkovou. (1)

3.3 Metoda elicitace

Elicitace je široce používaná ke zvýšení produkce nebo k vyvolání *de novo* syntézy sekundárních metabolitů v *in vitro* rostlinných kulturách. Elicitor působí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor. Elicitací je vyvolán stres, který aktivuje obranné reakce rostliny nebo rostlinného explantátu. Ty potom vedou ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů. Elicitace je zkoumána u rostlinných kultur zejména pro svoji jednoduchost a ekonomickou nenáročnost. Patří mezi nejefektivnější způsob, jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů u léčivých rostlin.

Sekundární metabolity rostlin jsou často považovány jako sloučeniny, které nemají podstatnou roli v životních procesech rostliny. Ale právě oni mají důležitou roli v interakci s vnějším prostředím pro adaptaci a obranu.

Základním předpokladem úspěšné elicitace je nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a také doby působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Mezi další faktory, které ovlivňují průběh elicitace, patří stáří rostlinné kultury, složení kultivačního média a přidání různých růstových regulátorů. (2) (26)

3.3.1 Rozdělení elicitorů (22)

Elicitory jsou obecně rozlišovány na abiotické a biotické.

Abiotické stresory jsou povahy fyzikální nebo chemické a patří sem:

- vysoké nebo příliš nízké záření
- extrémní teploty
- nedostatek vody, případně zaplavení vodou vedoucí k nedostatku kyslíku
- nedostatek esenciálních minerálních prvků v půdě
- nadbytek iontů v půdním roztoku
- vysoké nebo nízké hodnoty pH půdního roztoku
- přítomnost toxických látek (těžké kovy, organické látky)
- mechanické působení – vítr

Biotické stresory jsou povahy biologické a patří sem:

- působení patogenů (viry, mikroby, houby)
- působení konkurenčních druhů rostlin (alelopatie, parazitismus)
- poškození rostliny živočichy

3.3.2 Průběh stresové reakce u rostlin

Stres je stav rostliny, která reaguje na působení stresových faktorů aktivací obranných mechanismů. Odpověď na aktuální působení stresoru, stresová reakce vedoucí k toleranci, se obecně dělí na několik fází.

V první fázi, označované jako fáze poplachová, je rozeznáno působení stresoru v rostlině na základě narušení funkcí a struktur buněk. Informace je signálními cestami předána dalším kompartmentům buňky, vyvolá změny exprese určitých genů a následně je informace šířena i do ostatních částí rostliny.

Ve fázi následující, označované jako restituční, rostlina aktivuje příslušné obranné mechanismy, které mají navodit stav rostliny umožňující v podmínkách působení stresoru dále existovat. Otužením rostlina získá maximální odolnost, ve fázi rezistence působení stresoru toleruje a přežívá. Působí-li stresor silně a dlouhodobě, může dojít k vyčerpání dostupných energetických rezerv rostliny, ke ztrátě schopnosti odolávat působení stresoru a ke smrti rostliny.

Průběh a výsledek stresové reakce závisí na mnoha činitelích, které se týkají jak stresoru, tak reagující rostliny. U stresoru je nutné brát v úvahu zejména charakter stresoru, jeho velikost (odchylku od optimálního stavu), rychlost jeho nástupu a dobu působení. U rostliny je rozhodující její genotyp, vývojové stádium a fyziologický stav.

Stres má u rostlin značnou šíři projevů. Přechodné nebo trvalé zastavení růstu nemusí však platit vždy a pro všechny typy stresorů. U některých rostlin při působení určitých stresorů může být zvýšená růstová aktivita součástí obranných reakcí. Zastavení růstu je však obvyklým důsledkem metabolických změn, které mají zajistit přežití rostliny, energie je využívána k obranným reakcím. (22) Kromě elicitace jsou ještě jiné možnosti, jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů u rostlin, přidáním prekurzorů daným sekundárních metabolitů do média, využitím biotransformace nebo změnou složení živného média. (4)

3.4 Selen (27) (28) (29)

Selen je stopový prvek, který je esenciálním prvkem pro lidi i zvířata, ale jeho role u rostlin si žádá důkladnější výzkum.

U rostlin je považován v malém množství za prospěšný prvek, ale ve vysokých množstvích je toxický a mezi těmito koncentracemi je pouze nepatrná hranice. Hladina selenu menší než 1 mg/kg byla zjištěna jako prospěšná pro rostliny, zatímco vyšší hladina způsobuje toxicitu u mnoha zemědělských plodin.

3.4.1 Účinky selenu

Selen má katalytickou funkci u různé řady enzymů, které obsahují rezidua selenocysteinu jako část jejich aktivního místa. Je důležitý v antioxidaci u lidí a může hrát roli u antioxidačních procesů u rostlin. V nízké koncentraci se může účastnit jako růstový regulátor, antioxidant, faktor působící proti stárnutí, abiotický stresový modulátor a obranná molekula proti patogenům u rostlin. Role selenu jako povzbuzovače a inhibitoru růstu je zkoumána u různých plodin. Biofortifikace plodin selenem za použití agronomických a genetických přístupů je zkoumána zejména pro použití v oblastech, kde mají nedostatek selenu v potravinách.

Selen se distribuuje v různých částech rostliny, liší se to dle rostlinného druhu, stupně vývoje a fyzické kondici. V případě akumulace se akumuluje v mladých listech během raného vegetativního stupně růstu. Během reprodukční fáze se však vysoké hladiny selenu přesunou do semen a v listech potom hladina významně klesá.

V závislosti na koncentraci se může selen podílet na následujících třech úrovních biologické aktivity:

- stopové koncentrace jsou potřebné pro normální růst a vývoj
- střední koncentrace mohou být ukládány a udržují homeostatické funkce
- nadměrně zvýšené koncentrace mohou být toxické

3.4.2 Mechanismus toxicity selenu

Toxická hladina selenu u rostlin je obvykle 5 mg/kg, ale mezi zemědělskými plodinami je toxicita variabilní. Toxicita selenu může vzniknout díky substituci Se za S v proteinech nebo kvůli inhibici metylace díky jeho podobnosti se sírou. Tato podobnost Se-aminokyselin k jejich sirným analogům cysteinu a methioninu může narušit normální biologické reakce a enzymové funkce v buňce. Toxicita Se může být přičítána prooxidačním účinkům stejně tak metabolické poruše.

Shrift (1969) objevil že kumulátoři selenu *Morinda reticulata* a *Neptunia amplexicaulis* mohou akumulovat selen až v hodnotě 4000 mg Se/kg bez známek toxických symptomů. Je mnoho rostlin, u nichž může selen zpomalit růst a produkci, ale toxické hladiny pro různé druhy rostlin se liší. V případě rýže o 10 % menší výnos při koncentraci selenu 2 mg/kg. *Trifolium repens* ukazují redukci úrody při 330 mg Se/kg DW v kořenové části.

Příznaky toxicity

Vyšší koncentrace se projevují toxickými symptomy jako je zakrnění růstu, chloróza (abnormální redukce nebo ztráta normálního zeleného zbarvení listů), vadnutí nebo schnutí listů, snížením syntézy proteinů a dokonce i smrtí rostliny.

3.4.3 Dosavadní studie na vliv selenu u rostlin

Ve studii z roku 2014 byl zkoumán vliv Se na hromadění protirakovinných sloučenin selenu methylselenocysteinu a glukosinolátů v brukvovité zelenině. Výzkum probíhal u šesti nejvíce konzumovaných typů brukvovité zeleniny a to u brokolice, květáku, hlávkového zelí, čínského zelí, kapusty a růžičkové kapusty. Výsledky studie ukázaly, že selen byl schopen ovlivnit množství syntetizovaného SeMSCys (Se-methylselenocysteine) v brukvovitých výhoncích. Rozbor profilu glukosinolátů odhalil, že každá brukvovitá plodina kumulovala jiný typ a množství glukosinolátů. Květák dosáhl nejvyššího obsahu glukosinolátů. Brokolice obsahovala vysoké množství glukoraphaninu – prekurzoru pro potenciální protirakovinnou sloučeninu. Ze studie vyplynulo, že brukvovité výhonky mohou být ovlivněny selenem pro kumulaci SeMSCys bez negativního vlivu na obsah glukosinolátů, preventivně protirakovinných látek. (30)

Další studie zaměřená na výzkum fytochemické a biochemické aktivity selenu v *in vitro* kultivovaných rostlinných tkáních a orgánů *Allium sativum* L. ukázala schopnost česneku zakomponovat vysoké koncentrace Se do aminokyselin. Bylo dokázáno, že dodáním selenu se zvýšila produkce alliinu v rostlinných pletivech pěstovaných v *in vitro* podmínkách. Nárůst alliinu byl nejvyšší, jestliže médium obsahovalo 2–4 mg/l Se. Česnek může snadno načerpat selen z půdy a inkorporovat ho do aminokyselin. Selen přijatý česnekovými pletivy vede k produkci různých sloučenin selenu a deriváty seleno-aminokyselin včetně Se-methyl-L-selenocysteinu (MeSeCys) a γ -glutamylmethylselenocysteine (GluMeSeCys). Tyto seleno-aminokyseliny a selenoproteiny mohou být užitečné hlavně v prevenci rakoviny prsu, prostaty a leukemie. (28)

Přidání nízké koncentrace Se do půdy indukovalo zvýšené hodnoty všech sledovaných aminokyselin u brokolice, čaje a *Eruca sativa*.

Antioxidační aktivita selenu inhibující lipidovou peroxidaci zvýšila sklizeň u jílku vytrvalého 0,1–1,0 mg/l Se a dýně (*Cucurbita pepo*) 1,5 mg/l. (29)

Selen může také zpozdit stárnutí a podpořit růst sazenic tím, že zabrání snížení koncentrace tokoferolu a posílí aktivitu superoxid dismutázy (SOD). Oxidativní poškození způsobené abiotickým stresem se kompenzuje pomocí enzymatických antioxidačních systémů. Enzymatické systémy jako SOD (superoxid dismutáza), CAT (kataláza), GR (glutathion reduktáza) mají fyziologickou funkci při nestresových podmínkách, ale jejich aktivita může být oxidativním poškozením zvýšená. Při dodání selenu byla aktivita CAT zvýšená. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána v *in vitro* pletivech a explantátech v hodnotě 4 mg/l Se. Tyto výsledky ukazují, že toxicita selenu zprostředkovaná změnami v aktivitách antioxidačních enzymů je dávkově závislá. Vyšší hladina selenu také indukuje aktivitu CAT u *Spirulina platensis*. V porovnání u SOD aktivity nebyly zaznamenány nějaké změny při různých koncentracích selenu. Listy sazenic ječmene rovněž neukázaly významnou změnu v aktivitě SOD. Aktivita GR zvyšuje v závislosti na dávce svoji aktivitu u pletiv česneku. (28)

Studie z roku 2012 (31) zkoumala vliv působení roztoku kadmia, selenu a kombinace obou látek na rostlinu *Lepidum sativum*. Došlo se k závěru, že po expozici kadmii bylo dosaženo vyšší antioxidační aktivity a vzrostl zejména obsah glykosidicky vázaných fenolických látek. Nárůst antioxidační aktivity po působení selenu již nebyl tak značný jako u kadmia a zvýšil se zejména obsah volných fenolických látek.

Další studie z roku 2014 (32) se zabývala způsobem zmírnění slanosti u sojových bobů. Bylo zjištěno, že po listové aplikaci selenu v kombinaci s kyselinou salicylovou došlo ke zmenšení následků způsobených použitím solného roztoku u sóji luštinaté. Z výsledků studie vyplynulo, že k tomuto docházelo důsledkem zvýšení aktivity antioxidačních enzymů, snížením oxidačního stresu a vzrůstem obsahu prolinu, askorbátu a fotosyntetických pigmentů. Přispělo k tomu také snížení poměru iontů Na/K a regulace v distribuci živin.

Další studie se zabývala distribucí selenu a fenolických sloučenin v rostlině *Fagopyrum esculentum*, která byla pěstována ze semen namočených v roztoku selenu a pod různým stupněm UV-B záření. Semena pohanky byla namočena do roztoku selenanu a seleničitanu v různých koncentracích. Některé rostliny byly ozařovány během růstu UV-B zářením. Z výsledků vyplynulo, že větší obsah selenu v listech (více než 185 ng/g) byl detekován u rostlin, které vyrostly ze semen namočených v roztoku selenanu. Obsah selenu ve stoncích *Fagopyrum esculentum* nebyl nijak ovlivněn roztokem selenu ani UV-B zářením. (33)

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

Analytické váhy PRLT A13, Sartorius, Německo

Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR

Box s laminárním prouděním Fatran LF, Výrobné družstvo Pokrok, Slovensko

Filtrační papír

Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko

Horkovzdušný sterilizátor SVS 91, Chirana, ČR

Laboratorní sklo

Mikrofiltry (0,22 µm), Tessek, ČR

Pipetovací balónek, Filip, Německo

Sušárna HS 61A Chirana, ČR

Těsnění na vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc, ČR

Třepačka UNIMAX 2010, Heidolph Instruments, Německo

Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR

Vodní lázeň, TYP 1042, GFL, Německo

Kapalinový chromatograf:

Autosampler Jasci AS-2055 Plus, Japonsko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko

Fluorescenční detektor Jasco FP a2020 Plus, Japonsko

Kolona LiChrospher RP – 18, 250-4, sorbent Li Chrospher 5 µm

Předkolona, Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 µm

Termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko

4.2 Chemikálie

Ajatin plus roztok 10%, Profarma – produkt s.r.o, ČR

Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, Faf UK HK, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný p.s., Lachema, ČR

Dusičnan amonný, p.a., Penta, ČR

Dusičnan draselný p.a., Lach-Ner, ČR

Ethanol 96%, Lachema, ČR

Glycin, Sigma-Aldrich, USA

Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovensko

Chlorid kobaltnatý p.a., ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), Lachema, ČR

Chlorid vápenatý p.a., Penta, ČR

Jodid draselný p.a., Lachema, ČR

Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR

Kyselina nikotinová, Lachema, ČR

Kyselina o-fosforečná, Lachema, ČR

Kyselina α -naftyloctová, Sigma-Aldrich, USA

Methanol p.a., Lachema, ČR

Molybdenan sodný, Lachema, ČR

Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko

Oxid seleničitý, Sigma-Aldrich, USA

Pyridoxin puriss, Koch-Light Laboratories, Velká Británie

Sacharosa čistá, Lachema, ČR

Síran hořečnatý p.a., Lachema, ČR

Síran manganatý p.a., Lachema, ČR

Síran měďnatý p.a., Lachema, ČR

Síran zinečnatý ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Lachema, ČR

Síran železnatý čistý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Lachema, ČR

Standard silymarinu, Sigma-Aldrich, USA

Superčistá voda, Katedra analytické chemie, Faf UK HK, ČR

Thiamin, Koch- Light Laboratories, Velká Británie

4.3 Rostlinný materiál

K pokusu byly použity kultury odvozené z kořenové části klíčící rostliny *Silybum marianum* (L.) v 37.–43. pasáži.

4.4 Příprava pomůcek ke kultivaci

Během experimentu bylo používáno varné laboratorní sklo značky SIAL, které je odolné vůči výkyvům teplot a vůči působení chemikálií.

Pro kultivaci se použily Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml, do kterých byl vložen můstek z filtračního papíru a bylo nalito 30 ml živného média. Každá baňka byla překryta hliníkovou fólií a vysterilizována v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa.

4.5 Příprava živného média

Živné médium slouží jako minerální výživa a zdroj energie pro rostoucí explantátovou kulturu. Suspenzní i kalusové kultury *Silybum marianum* L. byly kultivovány na živném médiu Murashigeho a Skooga s přidavkem 1 ml (10 mg/l) růstového stimulantu α -naftyloctové kyseliny.

Složení živného média (34) je uvedeno v následujícím přehledu. Navážky jednotlivých složek jsou vyjádřeny v mg/l:

Makroelementy:

KNO ₃	1900,000
NH ₄ NO ₃	1650,000
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440,000
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄ . H ₂ O	170,000

Mikroelementy:

Na ₂ EDTA	37,340
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,840
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,300
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	11,500
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,250
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025

Vitamíny a organické sloučeniny:

Hydrolyzát kaseinu	1000,000
Myo-inositol	100,000
Sacharóza	30 000,0
Glycin	2,000
Kyselina nikotinová	0,500
Pyridoxin hydrochlorid	0,500
Thiamin hydrochlorid	0,100

Jednotlivé substance byly odváženy na analytických vahách, velmi malá množství kapalných složek půdy byla odměřena ze zásobních roztoků odpipetováním. Všechny součásti byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněny vodou až po rysku. Živné médium bylo rozléváno do vysterilizovaných baněk po 30 ml. Všechny baňky s médiem se překryly hliníkovou fólií a nechaly vysterilizovat v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa.

4.6 Pasážování a kultivace

K pasážování se používaly kalusové kultury rostliny *Silybum marianum* z předchozí kultivace (tzv. inokulum). Pasážování probíhalo v boxu s laminárním prouděním vzduchu vysterilizovaném germicidní lampou. Narostlé části kalusové kultury se sterilní pinzetou přemísťovaly do 100 ml Erlenmayerových baněk s živným médiem na papírové můstky z filtračního papíru.

Suspenzní kultury se připravily mechanickým rozmělněním kalusu pinzetou o stěny baňky přímo v živném médiu bez papírových můstek.

Na závěr se baňky opět překryly hliníkovou fólií a daly se kultivovat do kultivační místnosti, kde byla udržována stálá teplota 25 °C a světelný režim 8 hodin tmy a 16 hodin světla. Suspenzní kultury byly oproti kalusovým umístěny na třepačku (s rychlostí 120 otáček za minutu), která zajišťovala provzdušňování živného média.

Kultivace u kalusové kultury probíhala 3–4 týdny, u suspenzní kultury trvala kultivace cca. 2–3 týdny.

4.7 Příprava elicitoru

K elicitaci suspenzních i kalusových kultur rostliny *Silybum marianum* L. byl zvolen roztok oxidu seleničitého (SeO_2) v následujících koncentracích:

$$c_1 = 100 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$c_2 = 10 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$c_3 = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

K přípravě elicitoru bylo použito laboratorní sklo a nástroje, které byly předem vysterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru. Ředění roztoků elicitoru probíhalo za aseptických podmínek.

Roztok o koncentraci c_1 byl připraven navážením 100,0 mg čisté substance SeO_2 . Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100,0 ml a doplněna ultračistou vodou po rysku. Roztok byl promíchán a vysterilizován v autoklávu po dobu 20 minut (121°C , 100 kPa).

Odpipetováním 10,0 ml roztoku o koncentraci c_1 (100 mg/100 ml) a doplněním vodou po rysku na 100,0 ml byl připraven roztok o koncentraci c_2 (10 mg/100 ml).

Roztok o koncentraci c_3 (1 mg/100 ml) byl připraven odpipetováním 10 ml roztoku o koncentraci c_2 (10 mg/100 ml) a doplněním ultračistou vodou na 100 ml.

4.8 Elicitace *in vitro* kultur *Silybum marianum* L.

K elicitaci se používaly tři různé koncentrace roztoku elicitoru. Vliv každé koncentrace se zkoumal zvlášť na kalusových a suspenzních kulturách.

Ke každému pokusu bylo použito 30 Erlenmayerových baněk s narostlými kulturami pro jednotlivé koncentrace elicitoru. Zároveň bylo použito 6 baněk s narostlými kulturami pro odběr bez přídavku elicitoru jako kontrola.

Každá baňka byla nejdříve ošetřena roztokem Ajatinu. Práce probíhala asepticky v boxu s laminárním prouděním předem vysvíceném germicidní UV lampou minimálně hodinu před začátkem pokusu. Do každé baňky byl vnesen 1 ml elicitoru testované koncentrace pomocí sterilní pipety. U suspenzních kultur byl vnesen přímo do živného média, u kalusových kultur na filtrační papír. Poté byly baňky umístěny zpět do kultivační místnosti a postupně odebírány. U suspenzních kultur probíhala kultivace na třepače (120 otáček/min.).

Po uplynutí 6, 12, 24, 48, 72, 168 hodin bylo vždy odebráno pět baněk s elicitovanými kalusy. Kontrolní baňky se odebíraly pouze po 12, 48, 168 hodinách. Kalus byl rozprostřen na filtrační papír, vysušen za laboratorní teploty a poté uschován do hliníkových fólií pro další stanovení.

Ve stejných časech byly odebírány i suspenzní kultury. Suspenzní kultury byly zfiltrvány přes filtrační papír a zachycené shluky buněk byly také volně sušeny za laboratorní teploty. Vysušené kalusové a suspenzní kultury se poté použily ke stanovení obsahu flavonolignanů a taxifolinu.

V rámci každého časového intervalu byl odebrán i vzorek živného média, který byl následně zamrazen a uschován pro další analýzu.

Kontrola byla prováděna v čase 12, 48 a 168 hodin. Pro tyto odběry bylo určeno celkem 6 baněk, kam se místo roztoku elicitoru napipetovalo 1 ml ultračisté vody. Postup odběru byl identický jako u elicitovaných kultur.

4.9 Příprava extraktů pro stanovení obsahu

Odebrané a vysušené vzorky kalusových a suspenzních kultur byly rozmělněny v třecí misce tloučkem, zváženy na analytických vahách a převedeny do varných baněk o objemu 50 ml. Jednotlivé navážky měly hmotnost cca 0,38–1,98 g a byly pečlivě zaznamenány. K navážkám bylo přilito 10 ml metanolu. Následovala extrakce na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Roztok byl za horka zfiltrován přes malý kousek vaty. Vata byla vložena zpět do baňky, bylo přilito opět 10 ml metanolu a celá extrakce se zopakovala. Oba filtráty byly spojeny a doplněny po rysku metanolem 80% v odměrné baňce objem 25,0 ml. Výsledný roztok byl zfiltrován přes mikrofiltr (0,22 μm) a 1,7 ml bylo převedeno do označených vialek. Poté následovala analýza metodou HPLC.

Vzorky živného média byly rozmrazeny a odpařeny na vodní lázni. Odparek se rozpustil ve 20 ml metanolu a 1,7 ml bylo odebráno injekční stříkačkou a filtrováno přes mikrofiltr (0,22 μm) do vialek a následně analyzováno pomocí HPLC.

4.10 Stanovení obsahu metodou HPLC

4.10.1 Obecná charakteristika HPLC

Obsah silymarinového komplexu a taxifolinu byl stanoven metodou HPLC. Jedná se o separační metodu, která umožňuje jak kvalitativní tak kvantitativní analýzu. Využívá se pro stanovení obsahu, čistoty i ke zkouškám totožnosti. Pro stanovení obsahu se sleduje výška (plocha) jednotlivých píků.

4.10.2 Parametry HPLC analýzy

Analýza jednotlivých vzorků kultury *Silybum marianum* byla prováděna na chromatografické sestavě JASCO (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 µm) s ochranou předkolumnkou.

Složení mobilní fáze bylo následující:

Eluent A: voda (superčistá) s obsahem 0,15% kyseliny fosforečné

Eluent B: metanol s obsahem 0,15% kyseliny fosforečné

Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově z 0 % metanolu a 100 % vody v čase $t = 0$ minut do 50 % metanolu a 50 % vody v čase $t = 5$ minut. Poté probíhala eluce isokraticky z 50 % metanolu a 50 % vody do času $t = 25$ minut. Mobilní fáze obsahovala jako pufr 0,15% kyselinu fosforečnou.

Průběh eluce je znázorněn v následujícím přehledu:

čas 0 min. = 100 % A, 0 % B

čas 5 min. = 50 % A, 50 % B

čas 25 min. = 50 % A, 50 % B

K detekci byl použit DAD detektor v rozmezí vlnových délek 200–550 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 288 nm. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Objem nástřiku: 20 µl

Průtok: 1,4 ml/min.

Teplota kolony: 25 °C

Standardy: taxifolin, silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A a isosilybin B

4.10.3 Kalibrační křivky taxifolinu a jednotlivých flavonolignanů:

1. TAXIFOLIN

Obrázek 10 Kalibrační křivka taxifolinu

x: koncentrace (mg/g)

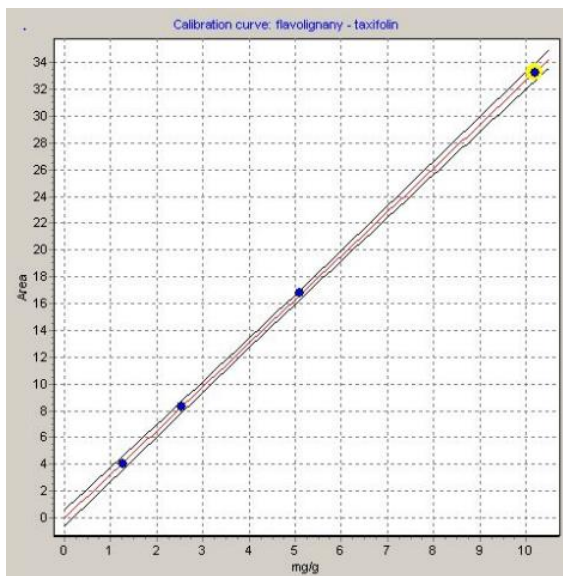
y: plocha

y: $bx+a$

regresní koeficient: 0,9999

a= 0

b=3,26361



2. SILYCHRISTIN

Obrázek 11 Kalibrační křivka silychristinu

x: koncentrace (mg/g)

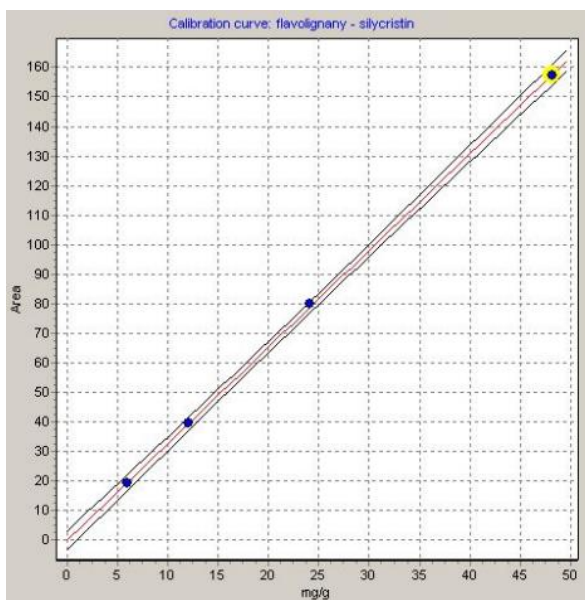
y: plocha

y: $bx+a$

regresní koeficient: 0,9999

a= 0

b=3,26964



3. SILYDIANIN

Obrázek 12 Kalibrační křivka silydianinu

x: koncentrace (mg/g)

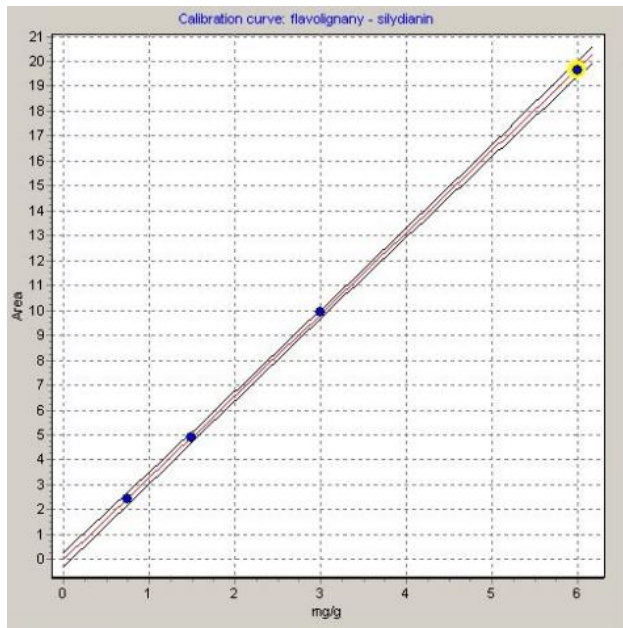
y: plocha

y: $bx+a$

regresní koeficient: 0,9999

a= 0

b=3,28186



4. SILYBIN A

Obrázek 13 Kalibrační křivka silybinu A

x: koncentrace (mg/g)

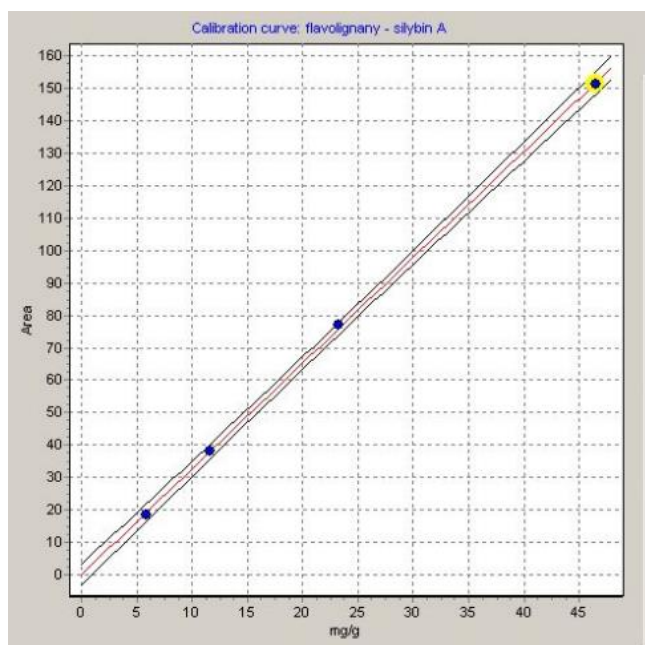
y: plocha

y: $bx+a$

regresní koeficient: 0,9999

a= 0

b=3,26609



5. SILYBIN B

x: koncentrace (mg/g)

y: plocha

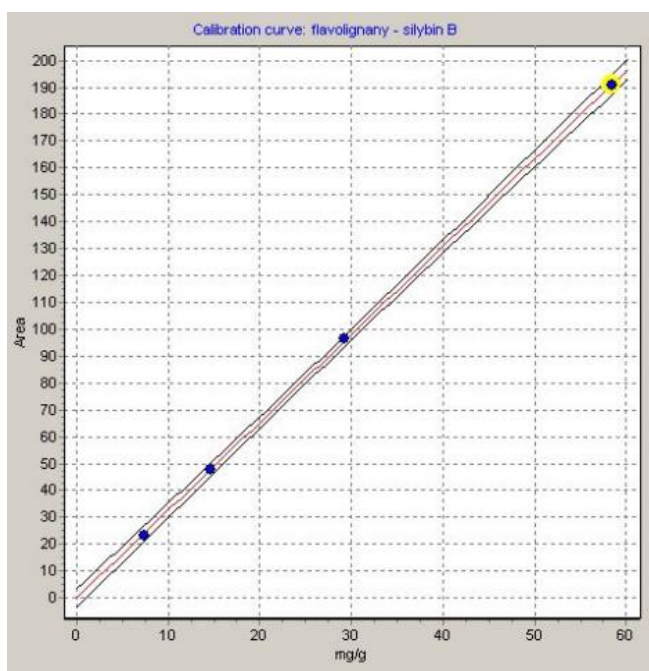
y: $bx+a$

regresní koeficient: 0,9999

a= 0

b=3,26957

Obrázek 14 Kalibrační křivka silybinu B



6. ISOSILYBIN A

x: koncentrace (mg/g)

y: plocha

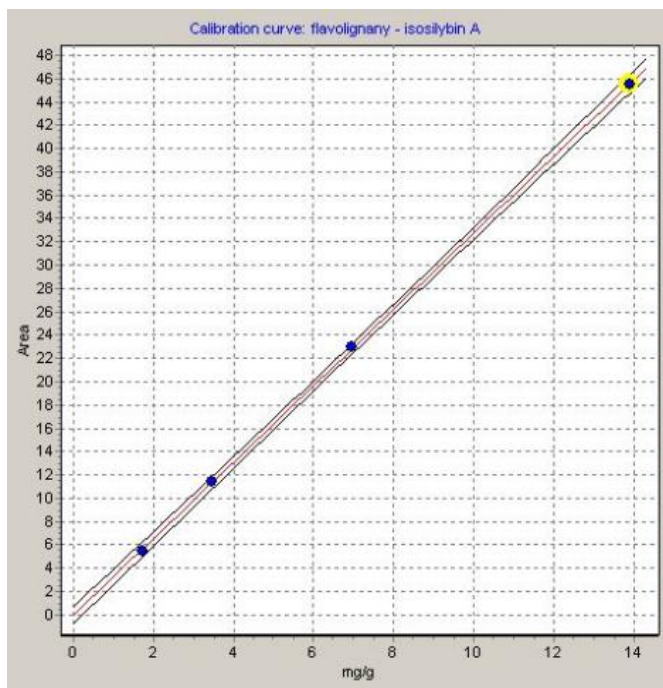
y: $bx+a$

regresní koeficient: 0,9999

a= 0

b=3,27665

Obrázek 15 Kalibrační křivka isosilybinu A



7. ISOSILYBIN B

Obrázek 16 Kalibrační křivka isosilybinu B

x: koncentrace (mg/g)

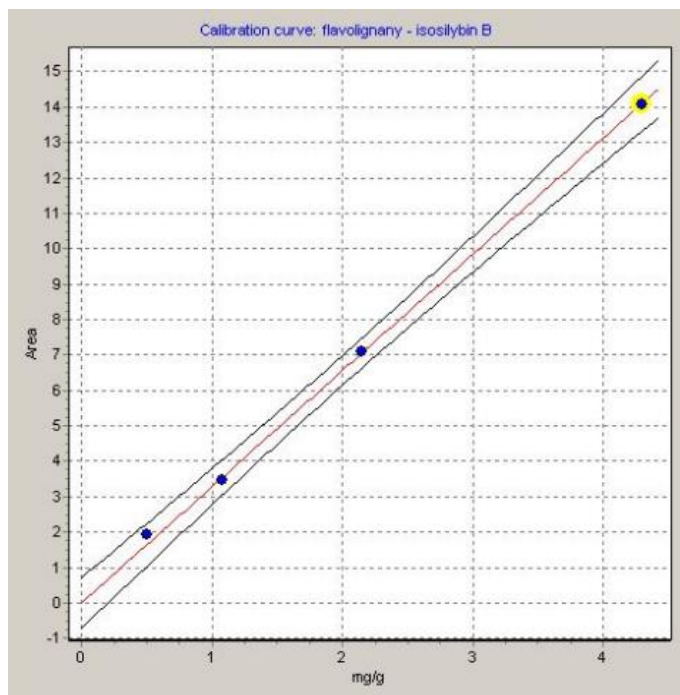
y: plocha

y: $bx+a$

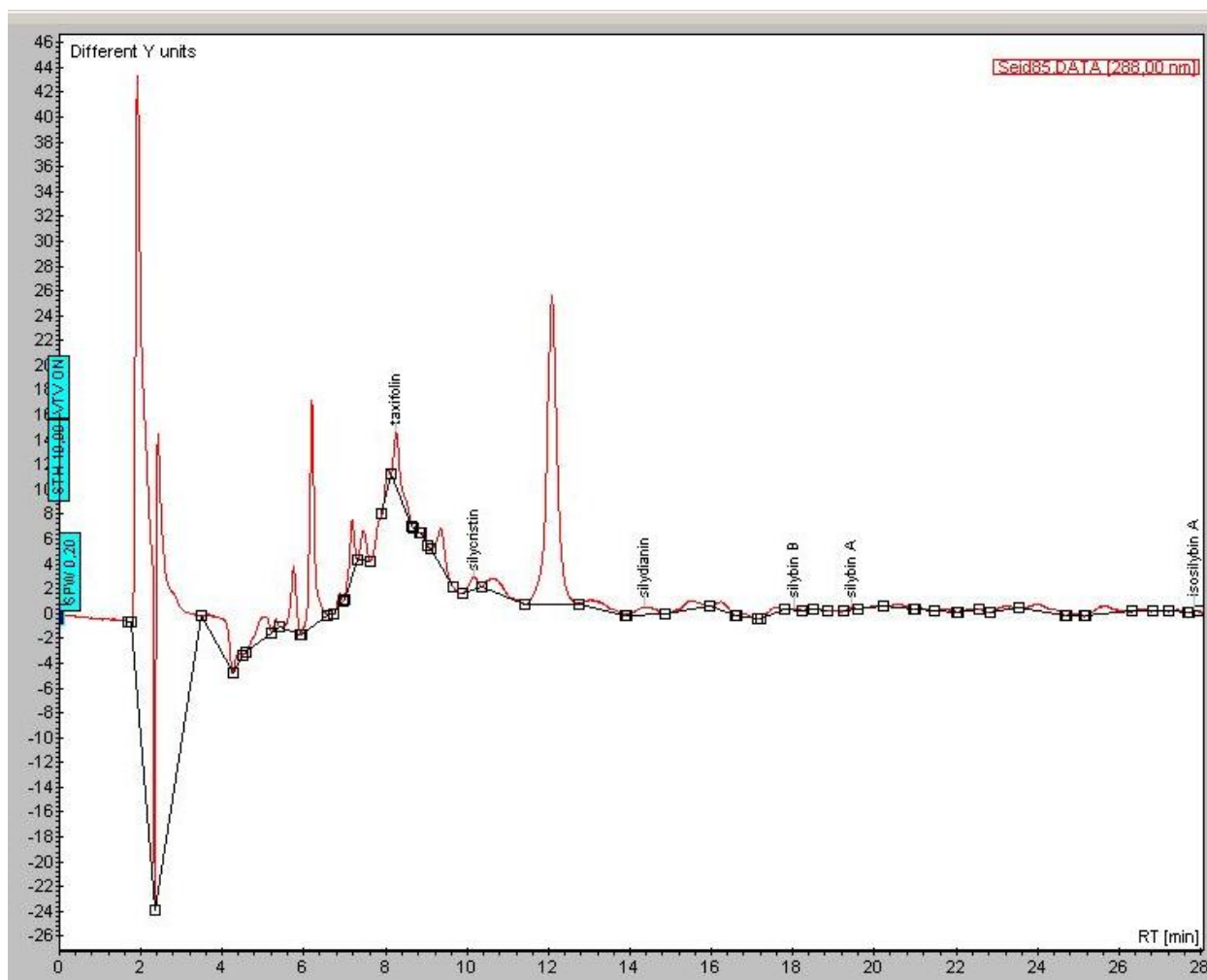
regresní koeficient: 0,9992

a= 0

b=3,28158



4.10.4 HPLC chromatogram standardu



Obrázek 17 HPLC chromatogram standardu silymarinu

4.11 Statistické zpracování výsledků (35) (36)

Statistickými charakteristikami nazýváme veličiny, které podávají stručnou informaci o souboru základních dat.

Aritmetický průměr je definován jako součet naměřených hodnot dělený jejich počtem. Jedná se o střední hodnotu souboru. Hodnota aritmetického průměru je blízká skutečně naměřené hodnotě. Vypočítá se dle vzorce:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

\bar{x} = průměr

n = počet hodnot v souboru

x_i = naměřená hodnota

Směrodatná odchylka je veličina, která vyjadřuje, jak se naměřené hodnoty liší od průměrné (střední) hodnoty.

Funkce směrodatné odchylky je definována vztahem:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

s = směrodatná odchylka

n = počet hodnot v souboru

\bar{x} = aritmetický průměr

x_i = naměřená hodnota

T-test

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavolignanů a taxifolinu byl použit t-test rozdílů dvou průměrů.

Pro testovací kritérium t-testu platí následující vztah:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

T - testovací kritérium

\bar{x}_1 - aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{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

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou kritickou hodnotou $t(v)$ pro vypočtený stupeň volnosti v a zvolenou hladinu významnosti p .

Počet členů pokusného i kontrolního souboru se vždy rovná $n_1 = n_2 = 3$. Stupeň volnosti pro testovací kritérium T byl vypočítán podle vzorce: $v = n_1 + n_2 - 2$. Počítáme tedy se stupněm volnosti $v = 4$.

Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a pro 4 stupně volnosti je tato kritická hodnota testovacího kritéria rovna 2,78.

Je-li vypočítaná hodnota testovacího kritéria T větší než kritická hodnota testovacího kritéria ($t(v)$) pro daný stupeň volnosti, je rozdíl hodnot $x_1 - x_2$ považován za statisticky významný.

Pro výpočet hodnot testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24 h byla použita kontrolní hodnota odběru po 12 h. Pro odběry 48 a 72 h byla použita kontrolní hodnota po 48 hodinách. A hodnota po 168 h působení elicitoru byla porovnávána s kontrolní hodnotou po 168 h. Pouze v případě absence vzorků některých z kontrolních médií se elicitované hodnoty porovnávaly s nejbližší možnou kontrolní hodnotou.

5 VÝSLEDKY

Tabulka 1 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$] v kalusové kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO_2

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Taxifolin [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silychristin [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silydianin [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silybin B [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silybin A [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Isosilybin A [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Isosilybin B [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silymarinový komplex [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]
$C_1=9,012\cdot 10^{-3}$	6h	0	0	0	0	0	0	0	0
	12h	0	0	0	0	0	0	0	0
	12h K	0,20	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h K	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	168h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h K	0,10	0	0	0	0	0	0	0
$C_2=9,012\cdot 10^{-4}$	6h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	12h	0	0	0	0	0	0	0	0
	12h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	48h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h K	0	0	0	0	0	0	0	0
$C_3=9,012\cdot 10^{-5}$	6h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	12h	0	0	0	0	0	0	0	0
	12h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	48h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	168h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h K	0	0	0	0	0	0	0	0

Pozn. 0 = naměřeno stopové množství nebo nebylo detekováno, K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

Tabulka 2 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$] v suspenzní kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO_2

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicítace [hod.]	Taxifolin [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silychristin [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silydianin [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silybin B [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silybin A [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Isosilybin A [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Isosilybin B [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]	Silymarinový komplex [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$]
$C_1=9,012\cdot 10^{-3}$	6h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	12h	0	0	0	0	0	0	0	0
	12h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	48h K	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	168h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	168h K	0	0	0	0	0	0	0	0
$C_2=9,012\cdot 10^{-4}$	6h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	12h	0	0	0	0	0	0	0	0
	12h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	48h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h K	0,20	0	0	0	0	0	0	0
$C_3=9,012\cdot 10^{-5}$	6h	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	12h	0	0	0	0	0	0	0	0
	12h K	0,10	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h K	0	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h	0	0	0	0	0	0	0	0
	168h K	0	0	0	0	0	0	0	0

Pozn. 0= naměřeno stopové množství nebo nebylo detekováno, K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

Tabulka 3 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100 ml] v živném médiu kalusových kultur *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Taxifolin [mg/100 ml]	Silychristin [mg/100ml]	Silydianin [mg/100ml]	Silybin B [mg/100 ml]	Silybin A [mg/100 ml]	Isosilybin A [mg/100ml]	Isosilybin B [mg/100ml]	Silymarinový komplex [mg/100ml]	
C ₁ = 9,012.10 ⁻³	6h	0,07	0,03	0,07	0,14	0,01	0,04	0	0,29	
	12h	0,05	0,23	0,04	0,11	0,05	0,08	0	0,51	
	12h K	0,32	0,02	0,29	0,07	0,04	0	0	0,42	
	24h	0,20	0,51	0,01	0,02	0,04	0,07	0	0,65	
	48h	0,22	0,57	0,03	0,04	0,08	0,06	0	0,78	
	48h K	absence média								
	72h	0,02	0,01	1,16	0	0	0	0	1,17	
	168h	0,11	0	0,13	0,01	0,17	0,04	0	0,35	
	168h K	0,35	0,22	0,03	0,04	0,05	0,25	0	0,59	
C ₂ = 9,012.10 ⁻⁴	6h	0,15	0,07	0,21	0	0	0,09	0	0,37	
	12h	0,27	0	0,02	0,02	0,11	0,04	0	0,19	
	12h K	0,22	0,11	0	0,02	0	0	0	0,13	
	24h	0,32	0,39	0	0,02	0	0	0	0,41	
	48h	2,81	0,08	0,14	0,02	0,04	0	0	0,28	
	48h K	1,04	0	0,03	0,06	0,18	0,09	0	0,36	
	72h	0,94	0,04	0,09	0,16	0,02	0,02	0	0,33	
	168h	0,57	1,39	0,05	0,06	0,04	0,10	0	1,64	
	168h K	0,24	0,15	0,07	0,06	0,08	0,07	0	0,43	
C ₃ = 9,012.10 ⁻⁵	6h	0,14	0	0,02	0,12	0,02	0,03	0	0,19	
	12h	0,18	0	0,08	0,03	0,03	0,03	0	0,17	
	12h K	absence média								
	24h	0,08	0,30	0,13	0,23	0,05	0	0	0,71	
	48h	0,27	0,07	0,10	0,01	0,01	0	0	0,19	
	48h K	1,04	0	0,03	0,06	0,18	0,09	0	0,36	
	72h	0,01	0,07	0,14	0	0	0,04	0	0,25	
	168h	2,01	0,99	0,05	0	0,01	0,02	0	1,07	
	168h K	0,24	0,15	0,07	0,06	0,08	0,07	0	0,43	

Pozn. 0= naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno, K= kontrolní vzorek (bez elicitoru), žlutě zvýrazněny - výsledky se statisticky významným nárůstem metabolitů oproti kontrolnímu vzorku

Tabulka 4 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100 ml] v živném médiu suspenzních kultur *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Taxifolin [mg/100ml]	Silychristin [mg/100ml]	Silydianin [mg/100 ml]	Silybin B [mg/100 ml]	Silybin A [mg/100 ml]	Isosilybin A [mg/100 ml]	Isosilybin B [mg/100 ml]	Silymarinový komplex [mg/100ml]
C ₁ = 9,012.10 ⁻³	6h	0,01	0,33	0	0	0	0,03	0	0,36
	12h	0,06	0	0,02	0,12	0,02	0	0	0,16
	12h K	1,20	0	0,04	0,07	0,03	0,08	0	0,22
	24h	1,25	0,05	0,06	0	0,11	0	0	0,22
	48h	4,05	0,36	0,23	0,20	0,05	0	0	0,84
	48h K	1,87	0,07	0,01	0,07	0,12	0,03	0	0,30
	72h	0,14	1,68	0,09	0,20	0,20	0,07	0	2,24
	168h	0,30	0,02	0,11	0,44	0	0,11	0	0,68
	168h K	0,09	0,10	0,04	0,05	0,01	0,01	0	0,21
C ₂ = 9,012.10 ⁻⁴	6h	0,02	0,12	0	0	0	0,01	0	0,13
	12h	0,03	0,01	0	0,26	0,01	0,06	0	0,34
	12h K	4,54	0,01	0,02	0,68	0,33	0	0	1,04
	24h	0,42	0,17	0,03	0	0	0	0	0,20
	48h	0	0,03	0,05	0,08	0,11	0,03	0	0,30
	48h K	0,11	0,47	0,03	0	0	0,04	0	0,54
	72h	0	0,59	0,05	0,08	0,20	0,15	0	1,07
	168h	0,08	0,02	0,37	0,10	0,01	0	0	0,50
	168h K	0,17	0,24	0	0,06	0,04	0	0	0,34
C ₃ = 9,012.10 ⁻⁵	6h	1,03	0	1,18	0,02	0,03	0	0	1,23
	12h	0,08	0,23	0,11	0,04	0,35	0,05	0	0,78
	12h K	4,02	0,01	0,01	0,41	0,28	0,04	0	0,75
	24h	2,00	0	0,04	0,06	0	0	0	0,10
	48h	0,01	0,36	0	0	0	0	0	0,36
	48h K	0,34	0	0	0	0	0	0	0
	72h	2,49	0	0	0	0	0	0	0
	168h	0	0,09	0,02		0	0,07	0	0,18
	168h K	0,03	0	0,27	0,24	0,05	0	0	0,56

Pozn. 0= naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno, K= kontrolní vzorek (bez elicitoru), žlutě zvýrazněny- výsledky se statisticky významným nárůstem metabolitů oproti kontrolnímu vzorku

Tabulka 5 Statistické zpracování výsledků obsahu silymarinového komplexu uvolněného do média kalusové kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod]	Silymarinový komplex [mg/100 ml]	Statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů
$c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$	6	$0,29 \pm 0,03$	-
	12	$0,51 \pm 0,02$	+
	24	$0,65 \pm 0,03$	+
	48	$0,78 \pm 0,03$	+
	72	$1,2 \pm 0,1$	+
	168	$0,35 \pm 0,02$	-
$c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$	6	$0,37 \pm 0,02$	+
	12	$0,19 \pm 0,02$	+
	24	$0,41 \pm 0,02$	+
	48	$0,28 \pm 0,02$	-
	72	$0,33 \pm 0,02$	-
	168	$1,6 \pm 0,1$	+
$c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$	6	$0,19 \pm 0,03$	-
	12	$0,17 \pm 0,02$	-
	24	$0,71 \pm 0,03$	+
	48	$0,19 \pm 0,03$	-
	72	$0,25 \pm 0,02$	-
	168	$1,1 \pm 0,1$	+

Tabulka 6 Statistické zpracování výsledků obsahu taxifolinu uvolněného do média kalusové kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod]	Taxifolin [mg/100ml]	Statisticky významné zvýšení obsahu taxifolinu
$c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$	6	0,07 ± 0,01	-
	12	0,05 ± 0,01	-
	24	0,20 ± 0,01	-
	48	0,22 ± 0,01	-
	72	0,02 ± 0,02	-
	168	0,11 ± 0,01	-
$c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$	6	0,15 ± 0,01	-
	12	0,27 ± 0,01	-
	24	0,32 ± 0,01	+
	48	2,8 ± 0,1	+
	72	0,94 ± 0,01	-
	168	0,57 ± 0,01	+
$c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$	6	0,14 ± 0,01	-
	12	0,18 ± 0,01	-
	24	0,08 ± 0,02	-
	48	0,27 ± 0,01	-
	72	0,01 ± 0,01	-
	168	2,0 ± 0,1	+

Tabulka 7 Statistické zpracování výsledků obsahu silymarinového komplexu uvolněného do média suspenzní kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂

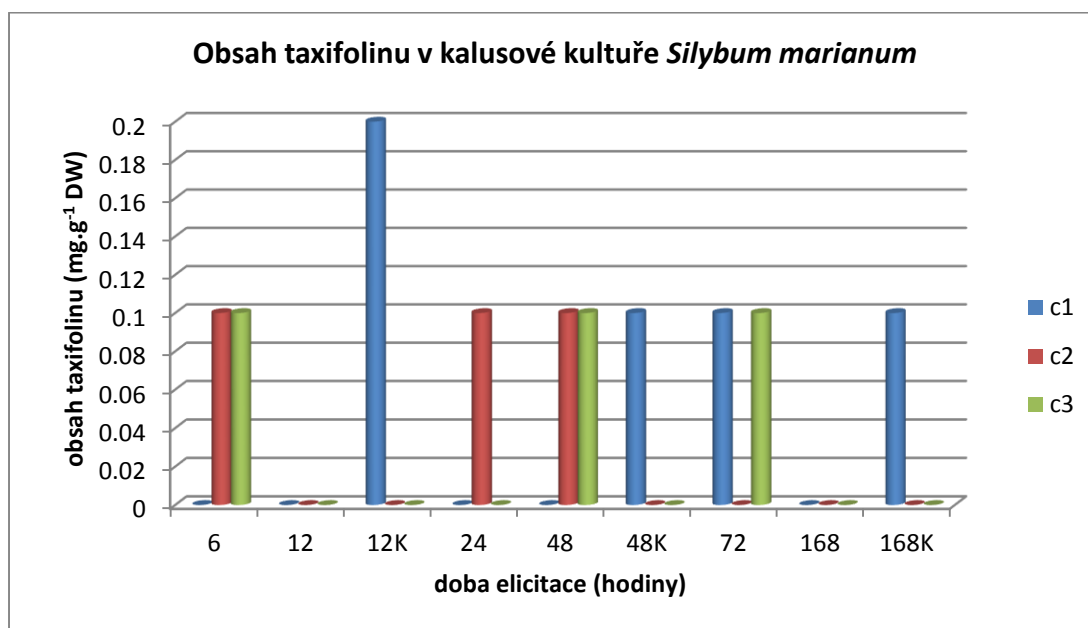
Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod]	Silymarinový komplex [mg/100ml]	Statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů
$c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$	6	0,36 ± 0,02	+
	12	0,16 ± 0,02	-
	24	0,22 ± 0,02	-
	48	0,84 ± 0,03	+
	72	2,2 ± 0,1	+
	168	0,68 ± 0,02	+
$c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$	6	0,13 ± 0,01	-
	12	0,34 ± 0,02	-
	24	0,20 ± 0,01	-
	48	0,30 ± 0,02	-
	72	1,1 ± 0,1	+
	168	0,50 ± 0,02	+
$c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$	6	1,2 ± 0,1	+
	12	0,78 ± 0,03	-
	24	0,10 ± 0,01	-
	48	0,36 ± 0,02	-
	72	0	-
	168	0,18 ± 0,02	-

Tabulka 8 Statistické zpracování výsledků obsahu taxifolinu uvolněného do média suspenzní kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod]	Taxifolin [mg/100ml]	Statisticky významné zvýšení obsahu taxifolinu
$c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$	6	0,01 ± 0,01	-
	12	0,06 ± 0,01	-
	24	1,3 ± 0,1	+
	48	4,1 ± 0,1	+
	72	0,14 ± 0,01	-
	168	0,30 ± 0,01	+
$c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$	6	0,02 ± 0,01	-
	12	0,03 ± 0,01	-
	24	0,42 ± 0,01	-
	48	0	-
	72	0	-
	168	0,08 ± 0,01	-
$c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$	6	1,0 ± 0,1	-
	12	0,08 ± 0,01	-
	24	2,0 ± 0,1	-
	48	0,01 ± 0,01	-
	72	2,5 ± 0,1	+
	168	0	-

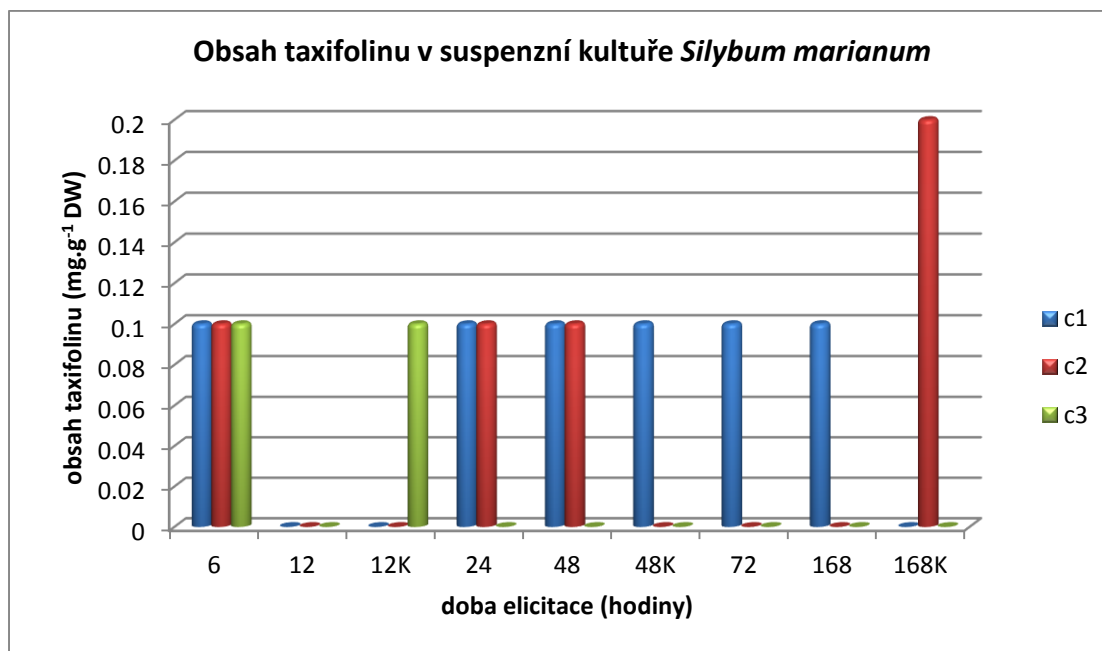
Grafické vyjádření obsahů taxifolinu a silymarinu v kulturách *Silybum marianum*

Graf 1 Obsah taxifolinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2



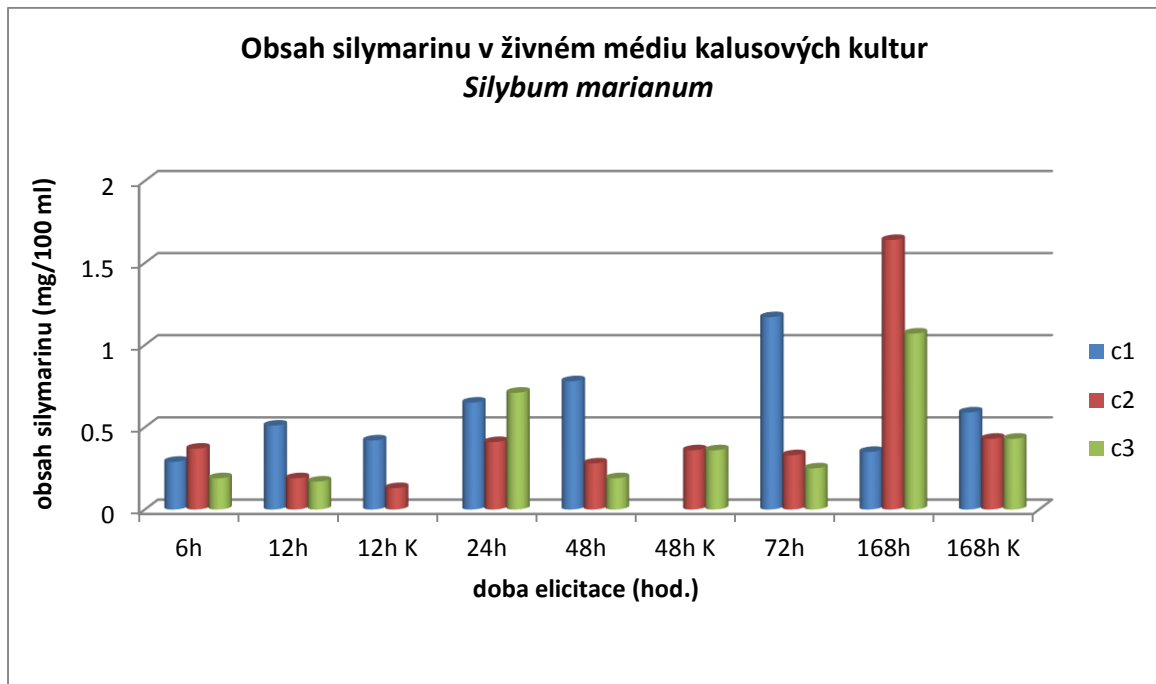
K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

Graf 2 Obsah taxifolinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2



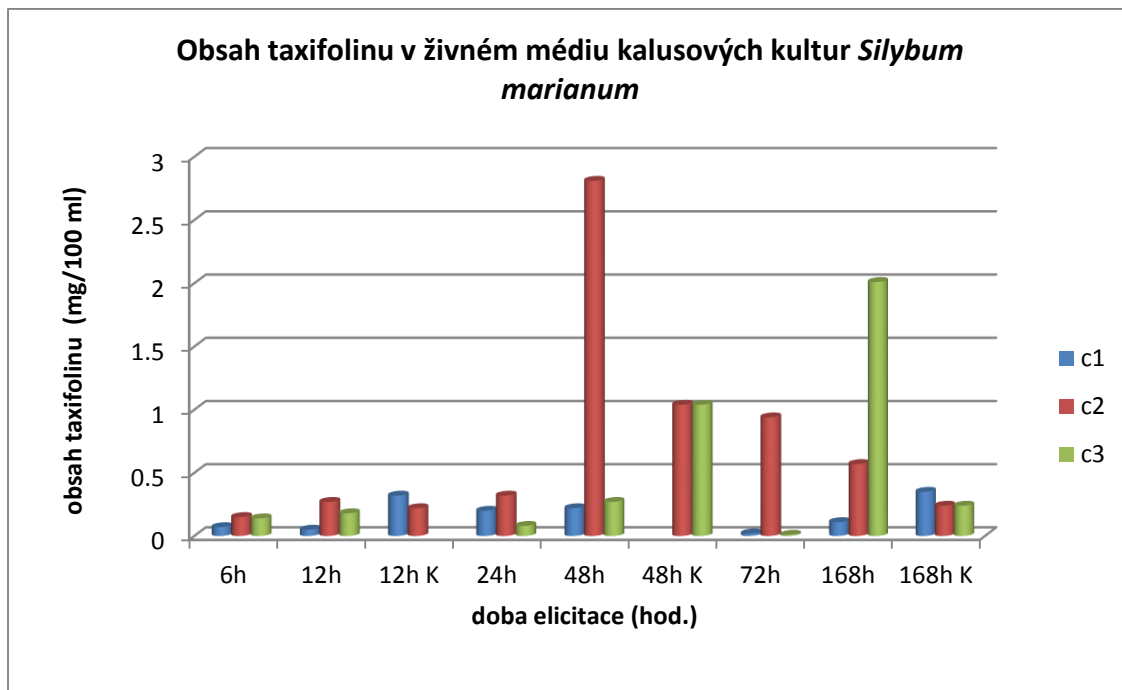
K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

Graf 3 Obsah silymarinu (mg/100 ml) v živném médiu kalusové kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO₂



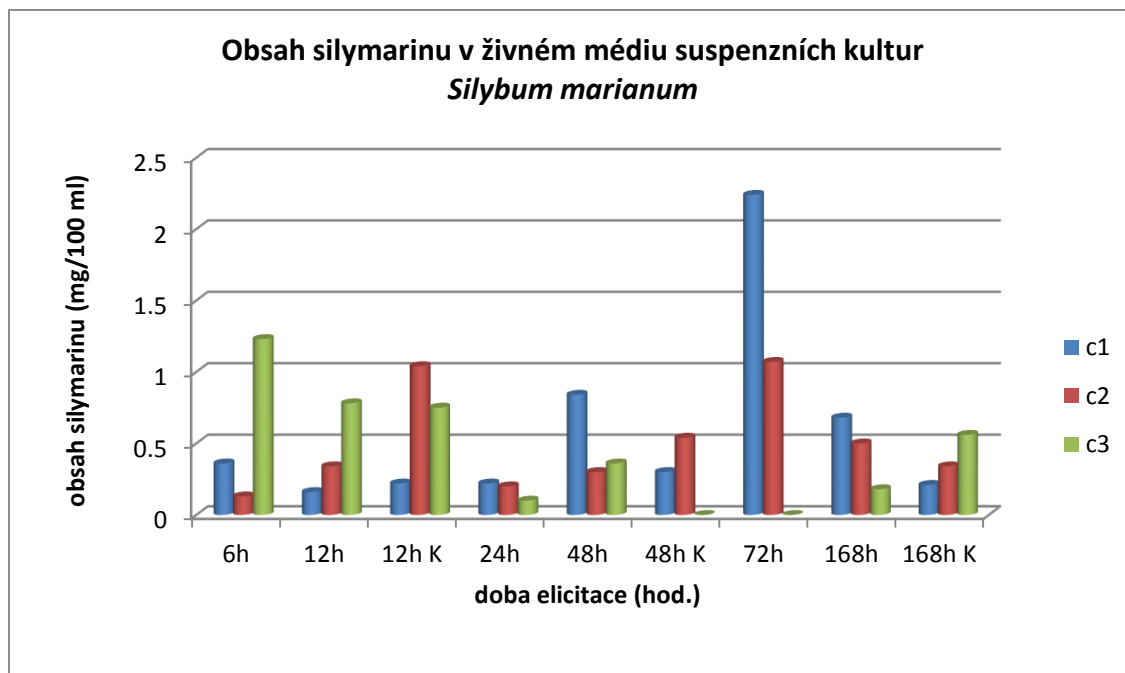
K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

Graf 4 Obsah taxifolinu (mg/100 ml) v živném médiu kalusové kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO₂



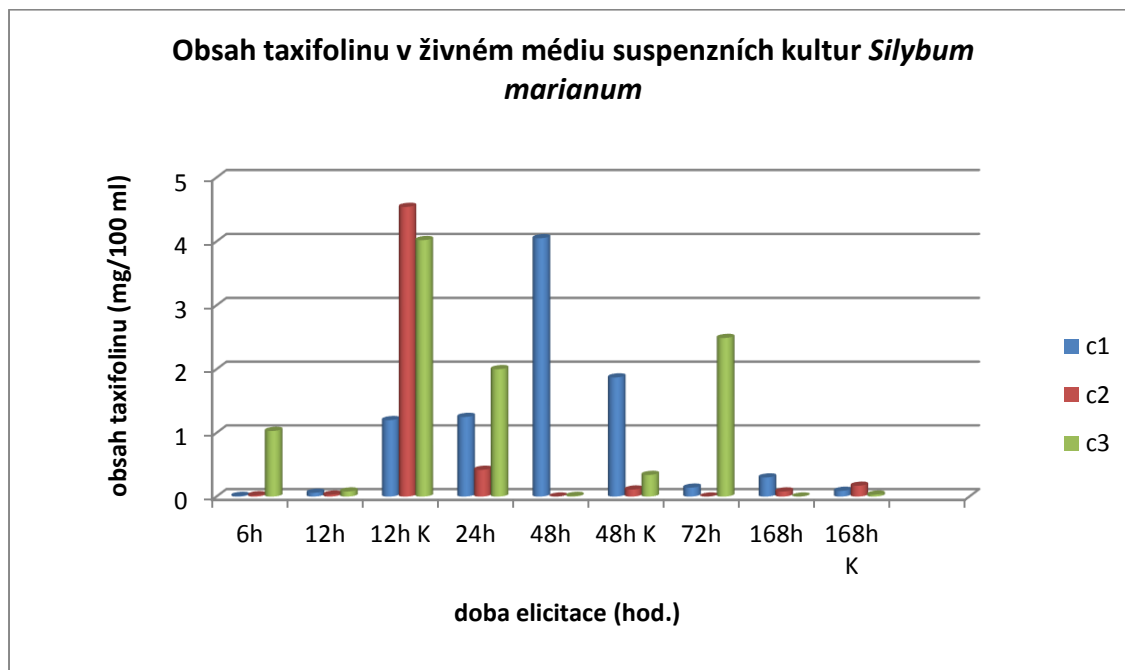
K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

Graf 5 Obsah silymarinu (mg/100 ml) v živném médiu suspenzní kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO₂



K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

Graf 6 Obsah taxifolinu (mg/100 ml) v živném médiu suspenzní kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO₂



K = kontrolní vzorek (bez elicitoru)

6 DISKUZE

Cílem této práce bylo seznámit se s metodou kultivace rostlinných explantátových kultur a zjistit vliv abiotického elicitoru iontů Se na produkci taxifolinu a silymarinového komplexu v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum*.

V této práci byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Silybum marianum* (L.) v 37.–43. pasáži. Kultura byla kultivována na médiu dle Murashigeho a Skooga s přídavkem 10 mg/l kyseliny α -naftyloctové.

Úspěšná elicitace závisí na mnoha faktorech, které jsou specifické pro každý elicitor i pro každou rostlinnou kulturu. Základním předpokladem úspěšné elicitace je nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a také doby působení na rostlinnou kulturu *in vitro*.

Z tohoto důvodu byl použit vodný roztok oxidu seleničitého ve třech různých koncentracích:

$$c_1 = 100 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$c_2 = 10 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$c_3 = 1 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Vliv tohoto elicitoru byl zkoumán po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách jeho působení a porovnáván s kontrolními vzorky, které byly odebírány po 12, 48 a 168 hodinách a obsahovaly místo elicitoru 1 ml sterilní vody.

Pro stanovení obsahu jednotlivých složek byla použita metoda HPLC.

Seleničité ionty byly zvoleny díky své prokázané antioxidační aktivitě. Selen má katalytickou funkci u různé řady enzymů, které obsahují rezidua selenocysteinu jako část jejich aktivního místa. Je důležitý v antioxidaci u lidí a může hrát roli u antioxidačních procesů u rostlin. U selenu hraje důležitou roli koncentrace. V malém množství je považován za prospěšný prvek, ale ve vysokých množstvích je toxický a mezi těmito koncentracemi je pouze nepatrná hranice. Bylo prokázáno, že v nízké koncentraci se může selen účastnit jako růstový regulátor, antioxidant, faktor působící proti stárnutí, abiotický stresový modulátor a obranná molekula proti patogenům u rostlin. (29) (28)

Kalusová a suspenzní kultura

V kalusové a suspenzní kultuře byla při elicítaci zaznamenána pouze nepatrná produkce taxifolinu. Hodnoty jednotlivých měření obsahu nepřesáhly 0,1 mg/g DW a nedošlo k žádnému statisticky významnému nárůstu produkce taxifolinu. (viz Tabulka 1, 2; Graf 1, 2) V kalusové kultuře byl tento obsah zaznamenán po 72 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_1 ; po 6, 24 a 48 hodinovém působení elicitoru v koncentraci c_2 a po 6, 48 a 72 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_3 . (viz Tabulka 1, Graf 1) V suspenzní kultuře byly zjištěné hodnoty produkce taxifolinu obdobné. Obsahu taxifolinu 0,1 mg/g DW bylo dosaženo po 72 hodinovém působení elicitoru v koncentraci c_1 ; po 6, 24, 48 hodinovém působení elicitoru v koncentraci c_2 a po 6, 48 a 72 hodinové elicítaci roztokem SeO_2 o koncentraci c_3 . (viz Tabulka 2, Graf 2)

Hodnoty obsahu silymarinového komplexu byly v kalusových a suspenzních kulturách nulové po působení elicitoru ve všech koncentracích včetně kontrolních měření. (viz Tabulka 1 a 2) Bylo to způsobeno tím, že se téměř veškeré sekundární metabolity uvolnily do živného média. Lze to odůvodnit tím, že docházelo vlivem transportních mechanismů k propouštění metabolitů ven z buněk. Obdobných výsledků dosáhl Priet a Corcherete (3), kteří přišli na to, že po elicítaci suspenzní kultury *Silybum marianum* methyljasmonátem a cyklodextriny dochází také k uvolňování všech metabolitů do živného média. Tuto kulturu využili pro studium mechanismů uvolňování sekundárních metabolitů kultury *Silybum marianum* do živného média. (výsledky studie popsány na str. 65)

Živná média kalusových a suspenzních kultur

V živných médiích kalusové a suspenzní kultury docházelo k významnému vyplavování taxifolinu a téměř všech složek silymarinového komplexu. (viz Tabulka 3 a 4) Byly zde detekovány tyto metabolity: taxifolin, silychristin, silydianin, silybin A a B a isosilybin A. Isosilybinu B nebyl detekován v kontrolních ani elicítovaných kulturách. (viz Tabulka 3 a 4)

Živné médium kalusové kultury

Ke statisticky významnému uvolňování flavonolignanů do média kalusové kultury došlo po 12, 24, 48 a 72 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_1 , dále po 6, 12, 24 a 168 hodinách elicítace roztokem o koncentraci c_2 a po 24 a 168 hodinách elicítace roztokem o koncentraci c_3 . (viz Tabulka 5)

Největší statisticky významné uvolňování flavonolignanů (1,6 mg/100 ml) bylo zjištěno po 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_2 . Druhé nejvyšší statisticky významné uvolňování flavonolignanů do média (1,2 mg/100 ml) nastalo po 72 hodinách ošetření elicítorem o koncentraci c_1 , kde byla detekována jediná složka silymarinového komplexu a to silydianin (1,16 mg/100 ml) a nepatrné množství silychristinu (0,01 mg/100 ml). (viz Tabulka 3 a 5) Třetí statisticky významné vyplavení flavonolignanů do

média kalusové kultury bylo zaznamenáno po 168 hodinách elicitace o koncentraci c_3 (1,1 mg/100 ml). (viz Tabulka 5)

V kontrolních vzorcích živných médií kalusové kultury bylo také pozorováno vyplavování složek silymarinového komplexu do média, avšak nedosáhlo se tak významných hodnot jako u elicitovaných kultur.

Nejvýhodnější se tedy z hlediska zvýšeného vyplavování flavonolignanů do média kalusové kultury jeví použitý elicitor v koncentraci c_2 a doba elicitace 168 hodin.

Graf 3 ukazuje vzrůstající efekt hodnot flavonolignanů a jeho závislost na době působení elicitoru u koncentrace c_1 . Docházelo k nejrovnoměrnějšímu nárůstu obsahu flavonolignanů až do 72 hodinového působení, poté produkce klesla. (viz Graf 3)

Také statisticky významné uvolňování taxifolinu bylo pozorováno v médiích kalusových kultur po elicitaci Se^{4+} . Nejvyšší nárůst taxifolinu byl změřen po 48 hodinách (2,8 mg/ 100 ml) elicitace roztokem o koncentraci c_2 . Druhé nejvyšší statisticky významné zvýšení obsahu bylo patrné po 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_3 (2,01 mg/100 ml). Další statisticky významné nárůsty obsahu taxifolinu byly shledány po 168 hodinách (0,57 mg/100 ml) a po 24 hodinách (0,32 mg/100 ml) působení elicitoru o koncentraci c_2 . (viz Tabulka 6)

Koncentrace elicitoru c_1 naopak nezpůsobila žádné statisticky významné zvýšení hodnot obsahu taxifolinu v médiu, nejvyšší hodnoty u této koncentrace byly naopak zaznamenány u kontrolních hodnot. (viz Tabulka 3 a 6)

Nejvýhodnější se tedy z hlediska zvýšeného vyplavování taxifolinu do média kalusové kultury jeví použitý elicitor v koncentraci c_2 a doba elicitace 48 hodin.

Živné médium suspenzní kultury

Ke statisticky významnému vyplavování flavonolignanů do živného média suspenzní kultury došlo po 6, 48, 72 a 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_1 a po 72 a 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_2 . Roztok elicitoru o koncentraci c_3 statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů způsobil pouze po 6 hodinové elicitaci. (viz Tabulka 7)

Největší nárůst obsahu flavonolignanů v médiu suspenzní kultury byl pozorován po 72 hodinách (2,2 mg/100 ml) elicitace roztokem o koncentraci c_1 . Druhé nejvyšší statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů bylo po 6 h (1,2 mg/100 ml) elicitace roztokem o koncentraci c_3 a třetí nejvyšší hodnota byla nameřena po 72 hodinách (1,1 mg/ 100 ml) působení elicitoru o koncentraci c_2 . (viz Tabulka 7)

V kontrolních vzorcích živných médií suspenzní kultury byla zaznamenána významná produkce složek silymarinového komplexu po 12 hodinách kultivace u kontrolního měření koncentrace c_2 (1,04 mg/100 ml). Ostatní hodnoty kontrolních měření dosahovaly průměrných hodnot. (viz Tabulka 4)

Pro zvýšení produkce flavonolignanů v živném médiu suspenzní kultury se tedy jeví nejlépe elicitator o koncentraci c_1 a doba elicitace 72 hodin. (viz Tabulka 7, Graf 5)

V médiu suspenzních kultur docházelo také k vyplavování taxifolinu. Nejvyšší statistický nárůst jeho obsahu nastal po působení elicitoru v koncentraci c_1 a to po 48 hodinách elicitace (4,1 mg/100 ml), koncentrace taxifolinu se oproti kontrolní hodnotě (1,87 mg/100 ml) více jak zdvojnásobila (viz Tabulka 4). Další nárůsty obsahu taxifolinu byly sledovány po 72 hodinách elicitace roztokem o koncentraci c_3 (2,5 mg/100 ml) a nepatrné zvýšení produkce taxifolinu bylo sledováno u koncentrace c_1 po 24 hodinách (1,25 mg/100 ml) a 168 hodinách (0,3 mg/100 ml) téže koncentrace. (viz Tabulka 8)

U koncentrace elicitoru c_2 nedocházelo ke zvyšování produkce taxifolinu vůbec, naopak nejvyšší hodnoty taxifolinu se dosáhlo u této koncentrace v kontrolním měření po 12 hodinách (4,54 mg/100 ml). Tato hodnota dosáhla dokonce větších hodnot v porovnání s elicitovanými kulturami. Další významné hodnoty se dosáhlo v kontrolním měření po 12 hodinách (4,02 mg/100 ml) u koncentrace c_3 . (viz Tabulka 4)

Porovnání působení elicitoru v médiích suspenzních a kalusových kultur

V médiu kalusové kultury bylo zaznamenáno častější statisticky významné vyplavování flavonolignanů v porovnání se suspenzní kulturou, která zase naopak dosahovala vyšších hodnot vyplavených flavonolignanů. Konkrétně dosáhla vůbec nejvyšší hodnoty obsahu flavonolignanů (2,2 mg/100 ml) v médiu suspenzní kultury při 72 hodinové elitaci roztokem o koncentraci c_1 . (viz Tabulka 5 a 7)

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že po působení elicitoru SeO_2 docházelo ke statisticky významné produkci silymarinového komplexu i taxifolinu v kalusových i suspenzních kulturách, avšak veškeré metabolity byly vyplavovány do média

Vlivem elicitoru SeO_2 se zabývala i rigorózní práce K. Sojkové, která zkoumala vliv tohoto elicitoru na explantátových kulturách *Hypericum perforatum*. Při elitaci bylo použito stejných koncentrací selenu a kultivace probíhala za stejných podmínek s rozdílem, že kontrolní vzorky byly odebírány pouze po 0 a 168 hodinách. Dospělo se k závěru, že oxid seleničitý zvýšil produkci flavonoidů hyperosidu i kvercitrinu v kultuře *Hypericum perforatum*. Nejvyšší produkce hyperosidu (0,2 %) byla detekována po působení SeO_2 v koncentraci c_1 ($9,012 \cdot 10^{-3}$ mol /l) při odběru po 168 hodinách v suspenzní kultuře a nejvyšší produkce kvercitrinu (0,37 %) bylo dosaženo v suspenzní kultuře také při koncentraci c_1 ale již po 6 hodinách elicitace. Naopak produkce těchto flavonoidů v kalusových kulturách nebyla nějak výrazně ovlivněna v porovnání se suspenzními kulturami, ale nejlepších

výsledků se dosáhlo také po elicitaci roztokem SeO_2 v koncentraci c_1 . Flavonoidy byly nalezeny v kalusových, suspenzních kulturách i v médiu. Z uvedených výsledků vyplynulo, že k elicitaci roztokem selenu je výhodnější použití suspenzní kultury a působení roztoku o koncentraci c_1 ($9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l). Výsledky této práce dokázaly, že SeO_2 je v některých případech schopen zvýšit produkci hyperosidu a kvercitrinu v suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L. a zároveň působí i na vylučování flavonoidů do živného média jak suspenzních tak kalusových kultur. (37)

Vliv selenu na produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* tkáňových a orgánových kulturách *Allium sativum* L. prokázal i Kapoor a kol. Z jeho výsledků vyplynulo, že selen je schopen zvýšit produkci aliinu. (28)

I ve studii zabývající se vlivem působení kadmia a selenu na rostlinu *Lepidium sativum* bylo prokázáno, že nárůstem antioxidační aktivity selenu se zvyšuje u této rostliny obsah fenolických látek. (31)

Transportem flavonolignanů do živného média elicitovaných suspenzních kultur *Silybum marianum* se zabývala studie Prieta a Corcheta. Cílem této práce bylo objasnit možné mechanismy uvolňování silymarinu do živného média suspenzních kultur. Pro studium specifických transportních mechanismů byla použita buněčná suspenzní kultura *Silybum marianum* elicitovaná methyljasmonátem a cyklodextriny, u které bylo dokázáno, že je schopna uvolňovat složky silymarinového komplexu do média.

Postupně byly ke kultuře přidávány různé inhibitory transportních mechanismů. Přidání ionoforu nebo NH_4Cl způsobilo malý efekt u elicitovaných kultur. To bylo ukazatelem toho, že sekundární transport, který využívá elektrochemický gradient, se nepodílí na vyplavování metabolitů. Několik inhibitorů ABC transportérů ukázalo odlišný efekt. Typický inhibitor ATPasové aktivity ortho-vanadát sodný se choval ke kulturám vysoce toxicky a dokonce i ve velmi nízkých koncentracích. Inhibitor vápníkových kanálů verapamil neovlivnil vůbec akumulaci metabolitů v médiu. Glybenklamid a probenecid, zástupci inhibitorů ABCC typu ABC transportérů, značně snížily sekreci silymarinu do média. Částečná cDNA, SmABC1, ukázala podobnost ke ABCC typu ABC transportérů. Byla izolována RT-PCR ze silymarinu, kterého produkovaly kultury. Expres SmABC1 byla poháněna methyljasmonátem a cyklodextriny. Brefeldin A, fungální metabolit, který ovlivňuje vezikulární směňování, tím, že zabraňuje výměnu GTP/GDP, potlačil uvolňování do média v závislosti na dávce.

Tyto výsledky ukázaly, že exkrece silymarinu a jeho prekurzorů je závislá na aktivním transportu a řízení těchto pochodů se účastní také vezikulární směňovací systém.

Biosyntéza silymarinu probíhá oxidativním párováním taxifolinu a koniferyalkoholu v reakci katalyzované peroxidázou. *In vivo*, biosyntéza silymarinu je spojena s tvorbou v plodech a aktivní flavonolignany jsou kumulovány pouze ve slupce. V buněčných kulturách, jak koniferyalkohol, taxifolin i silymarin byly detekovány v médiu. Jestliže vezmeme v úvahu, že extracelulární médium suspenzní kultury by mohlo být považováno jako apoplastický

prostor tedy připomínající stěnu plodu mohlo by být předpokládáno, že koniferylalkohol a taxifolin budou exportovány nezávisle a radikální párování těchto prekurzorů by mohlo probíhat extracelulárně apoplastickými proteiny. (3)

Další práce, které se zabývaly elicitací explantátových kultur *Silybum marianum* došly také k pozitivním výsledkům na produkci flavonolignanů:

Ve studii z roku 2009 byl studován vliv potenciálního elicitoru – methylviologenu na produkci flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum*. Methylviologen neboli paraquat se řadí mezi bipyridilové herbicidy, které jsou používány jako kontaktní herbicidy či vysušovala polí. Jako elicitor byl použit roztok methylviologenudichlorid dihydrátu v etanolu ve třech koncentracích. V kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonolignanů pouze po 6 hodinové elicitaci methylviologemem o koncentraci c_2 ($2,19 \cdot 10^{-4}$ mol/l) a to o 1250 %. Po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách se obsah flavonolignanů zvýšil jen nepatrně nebo naopak významně poklesl. U zbývajících testovaných koncentrací elicitoru při aplikaci k suspenzní kultuře byl nárůst flavonolignanů minimální. (20)

Kladných výsledků při elicitaci *Silybum marianum* různými elicitory bylo dosaženo i v jiných diplomových nebo rigorózních pracích:

Byl zkoumán např. vliv ceritých iontů na produkci flavonolignanů kalusovou a suspenzní kulturou *Silybum marianum*. V kalusové kultuře *Silybum marianum* po elicitaci ceritými ionty byl detekován silychristin a taxifolin. V suspenzní kultuře *Silybum marianum* po elicitaci ceritými ionty byl detekován pouze flavonoid taxifolin. Kontrolní vzorky neprodukovaly žádné metabolity. Produkce flavonolignanů v této kultuře byla nízká, ale k pozitivním výsledkům u elicitovaných kultur docházelo. Ze získaných výsledků vyplynulo, že ke statisticky významné produkci jak silymarinu, tak i taxifolinu, docházelo pouze u kalusové kultury. Produkce flavonolignanů v suspenzní kultuře byla ovlivněna minimálně. (38)

Další diplomová práce se zabývala elicitací elektrickým proudem s různým rozsahem napětí v *in vitro* kulturách *Silybum marianum*, které byly vystaveny elektrickému proudu o dané intenzitě s měnícím se rozsahem napětí a dobou působení. V určitých podmínkách byl zaznamenán nárůst obsahu taxifolinu, silychristinu a silydianinu. (39)

Dalším studovaným elicitem působícím na *in vitro* kultury *Silybum marianum* byl ethephon v zkoumaný v pěti koncentracích. Výsledky jeho působení byly porovnávány s působením inhibitoru ethephonu (AgNO_3). U tohoto elicitoru docházelo ke statisticky významné produkci taxifolinu. Statisticky významné hodnoty zvýšení silybinu A se nacházely v živném médiu kultury. U inhibitoru AgNO_3 byl zaznamenán jak statisticky pozitivní, tak i negativní vliv na produkci kultur. (40)

Zkoumaný elicitor 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid působil také pozitivně na produkci flavonolignanů v *in vitro* kulturách *Silybum marianum*. Maximální obsah flavonolignanů byl detekován u elicitovaných kultur jak v kalusové, tak suspenzní

kultuře. U obou kultur přecházely metabolity do média, kde bylo naměřeno také zvýšení hodnot oproti kontrolním hodnotám. (41)

Pozitivní vliv na kulturu *in vitro* *Silybum marianum* byl prokázán u elicitoru (3-jod-4-methylfenyl)amidu 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny v suspenzní i kalusové kultuře. (42)

7 ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout následovně:

1. Minimální produkce taxifolinu a silymarinu v buňkách kalusových a suspenzních kultur *Silybum marianum* byla způsobena vyplavováním metabolitů do živných médií, kde byly ve značné míře detekovány.
2. V kalusové a suspenzní kultuře po elicitaci seleničitými ionty byl detekován pouze flavonoid taxifolin v nulovém nebo minimálním množství (0,1 mg/g DW).
3. Hodnoty obsahu flavonolignanů byly v buňkách kalusových i suspenzních kultur nulové.
4. Statisticky nejvýznamnější uvolňování flavonolignanů (2,2 mg/100 ml) do média suspenzní kultury nastalo po 72 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_1 .
5. Taxifolin dosáhl nejvyšší hodnoty po 12 hodinách kultivace (4,54 mg/100 ml) v médiu suspenzní kultury v kontrolním měření bez přídavku elicitoru u koncentrace c_2 . Statistické zvýšení obsahu taxifolinu v médiu suspenzní kultury bylo nejvyšší po 48 hodinovém působení elicitoru o koncentraci c_1 (4,05 mg/100 ml).
6. Statisticky nejvyšší produkce flavonolignanů v médiu kalusové kultury bylo dosaženo po 168 hodinovém působení (1,64 mg/100 ml) elicitoru o koncentraci c_2 , avšak nebylo dosaženo tak vysoké hodnoty jako u kultury suspenzní.
7. Statisticky nejvýznamnější množství taxifolinu bylo uvolněno do média kalusové kultury po 48 hodinách působení SeO_2 o koncentraci c_2 .
8. Produkce flavonolignanů i taxifolinu v kultuře *Silybum marianum* dosahuje vyšších výsledků v suspenzních kulturách. Neoptimálnější koncentrace oxidu seleničitého pro produkci flavonolignanů je c_1 a doba působení 72 hodin. V porovnání u kalusových kultur se nedosáhlo sice takto vysokých hodnot, ale celkově došlo k více hodnotám se statisticky zvýšeným obsahem.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HDL = high density lipoproteins, vysokodenzitní lipoproteiny

LDL = low density lipoproteins, nízkodenzitní lipoproteiny

DW = dry weight, sušina

HPLC = high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HIV = human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti

UV-B = ultra-violet, ultrafialové záření středovlnné, vlnová délka 320–280 nm

SeMSCys = Se-methylselenocysteine

DAD = diodearray-detector, detektor s diodovým polem

ABC transportéry = ATP Binding Cassette, souhrnné označení pro obrovské množství různých transmembránových proteinů schopných aktivně přenášet různé látky dovnitř či ven přes membránu za spotřeby ATP

RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction

GTP = guanosintrifosfát

GDP = guanosindifosfát

cDNA = complementary DNA

SmABC1 = silymarin ATP binding cassette 1

ATPasová aktivita = adenosin trifosfátová aktivita

9 SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1** Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g⁻¹DW] v kalusové kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂ 48
- Tabulka 2** Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g⁻¹DW] v suspenzní kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂... 49
- Tabulka 3** Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100 ml] v živném médiu kalusových kultur *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂..... 50
- Tabulka 4** Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100 ml] v živném médiu suspenzních kultur *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂..... 51
- Tabulka 5** Statistické zpracování výsledků obsahu silymarinového komplexu uvolněného do média kalusové kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂ 52
- Tabulka 6** Statistické zpracování výsledků obsahu taxifolinu uvolněného do média kalusové kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂..... 53
- Tabulka 7** Statistické zpracování výsledků obsahu silymarinového komplexu uvolněného do média suspenzní kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂ 54
- Tabulka 8** Statistické zpracování výsledků obsahu taxifolinu uvolněného do média suspenzní kultury *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru SeO₂..... 55

10 SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1** Obsah taxifolinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2 56
- Graf 2** Obsah taxifolinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2 56
- Graf 3** Obsah silymarinu ($\text{mg}/100$ ml) v živném médiu kalusové kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2 57
- Graf 4** Obsah taxifolinu ($\text{mg}/100$ ml) v živném médiu kalusové kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2 57
- Graf 5** Obsah silymarinu ($\text{mg}/100$ ml) v živném médiu suspenzní kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2 58
- Graf 6** Obsah taxifolinu ($\text{mg}/100$ ml) v živném médiu suspenzní kultury *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru SeO_2 58

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Ostropestřec mariánský (8)	10
Obrázek 2 Sazenice <i>Silybum marianum</i> (10).....	11
Obrázek 3 Detail bíle skvrnitých listů (10)	11
Obrázek 4 Vzrostlá rostlina v květu (10)	12
Obrázek 5 Detail květu (10).....	12
Obrázek 6 Bílé chmýří (10).....	12
Obrázek 7 Mláčení okřídlených semen (10)	12
Obrázek 8 Biosyntéza flavonolignanů (19)	17
Obrázek 9 Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu (20)	18
Obrázek 10 Kalibrační křivka taxifolinu.....	41
Obrázek 11 Kalibrační křivka silychristinu	41
Obrázek 12 Kalibrační křivka silydianinu	42
Obrázek 13 Kalibrační křivka silybinu A	42
Obrázek 14 Kalibrační křivka silybinu B	43
Obrázek 15 Kalibrační křivka isosilybinu A.....	43
Obrázek 16 Kalibrační křivka isosilybinu B.....	44
Obrázek 17 HPLC chromatogram standardu silymarinu.....	45

12 BIBLIOGRAFIE

1. **Kováč J.** *Explantátové kultury rostlin*. Olomouc : Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995, 1–23.
2. **Ramakrishna A., Ravishankar GA.** Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & Behavior*. 2011, 6, 11, 1720–1731.
3. **Prieto D., Corchete P.** Transport of flavonolignans to the culture medium of elicited cell suspensions of *Silybum marianum*. *Journal of Plant Physiology*. 2014, 171, 63–68.
4. **Tůmová L., Gallová K.** Terapeutické účinky *Silybum marianum*. *Praktické lékárenství*. 2006, 2, 4, 185–187.
5. **Janča J., Zentrich J.A.** *Herbář léčivých rostlin L-P*. Praha : Eminent, 1995, 216–219.
6. **Farmer-Knowles H.** *Léčivé rostliny od A do Z*. Praha : Metafora, 2011, 90–91.
7. **Korbelář J., Endris Z.** *Naše rostliny v lékařství*. Praha : Avicenum, 1990, 306.
8. **Jahodář L.** *Silybum marianum*. [Online] [Citace: 8. 3 2016.] <http://www.avicenna.cz/item/silybum-marianum-ostropestrec-mariansky>.
9. **Vermeulen N.** *Encyklopedie bylin a koření*. Čestlice : Rebo, 2001, 273–274.
10. Jedlý bodlák ostropestřec mariánský. *Potravinové zahrady*. [Online] 2008. [Citace: 20. 1 2016.] <http://www.potravinovezahrady.cz/bodlak-v-permakulturni-zahrade-ostropestrec-mariansky/>.
11. **Ministerstvo zdravotnictví ČR .** *Český lékopis*. Praha : Grada, 2009, 1511-1514.
12. **Suchopár J., Valentová Š.** *Remedia Compendium*. Praha : Panax, 2009, 37.
13. Silymarin. *Celostní medicína.cz, Informační server o zdraví z pohledu celostní, přírodní, alternativní medicíny*. [Online] 2008. [Citace: 7. 1 2016.] <http://www.celostnimedicina.cz/silymarin.htm#ixzz3u8ZIKFip>.
14. **SÚKL.** Souhrn údajů o přípravku - Flavobion. [Online] [Citace: 8. 3 2016.] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0103787&tab=texts>.

15. *Ostropestřec mariánský – jak užívat, léčivé účinky, dávkování, ceny.* [Online] 2016 [Citace: 16. 2. 2016.] <http://www.mujoastropestrec.cz/>.
16. *AISLP. Mikro- verze AISLP pro MS Windows,* 2013. [Citace: 30.3. 2016]
17. **Křen V., Walterová D.** Silybin and silymarin - new effects and applications. *Current Medicinal Chemistry.* 2007, 14, 315–338.
18. **AbouZid S.** Silymarin, natural flavonolignans from milk thistle - *Phytochemicals - Aglobal perspective of their role in nutrition and health.* INTECH open. [Online] 2012, 12, 255–267. [Citace: 2. 3 2016.] <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/silymarin-natural-flavonolignans-from-milk-thistle>
19. **Kolářová P.** Preparativní diastereomerní dělení silybinu a jeho sulfátů pomocí RP-HPLC. *Bakalářská práce.* Přírodovědecká fakulta, UK v Praze, 2010, 14
20. **Tůma J., Tůmová L.** Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přísávkem elicitoru paraquat. *Chemické listy.* 2009, 103, 503–510.
21. **Dubová J., Smíšková A.** Od rostlinné kultury „*in vitro*“ k biotechnologiím. [Online] 2014. [Citace: 2. 3 2016.] <https://educoland.muni.cz/down-50/>.
22. **Pavlová L.** *Fyziologie rostlin.* Praha : Karolinum, 2005, 140–143.
23. **Sikyta B.** *Biotechnologie pro farmaceuty.* Praha : Karolinum, 2001, 75–83.
24. **Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T. A., Vasil I. K.** Plant tissue culture media. [Online] 1976, 473–478. [Citace: 10. 3 2016.] http://link.springer.com/article/10.1007%2F978-1-4613-2796-4_27
25. **Saad A.I.M., Elsha A.M.** Plant tissue culture media - Recent advances in plant *in vitro* culture. *INTECH open.* [Online] 2012, 2, 29–38. [Citace: 20. 1 2016.] <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>
26. **Patel H., Krishnamurthy R.** Elicitors in Plant Tissue Culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2013, 2, 2, 60-65.

27. *Cizorodé prvky: Selén. Multimediální učební texty z výživy rostlin.* [Online] 2012. [Citace: 20. 1 2016.] http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/cizorode_prvky.htm.
28. **Rashmi Kapoor, Sekh Abdul Nasim, Bhupinder Dhir, Mahmooduzzafar, Abdul Mujib.** Selenium treatment alters phytochemical and biochemical activity of in vitro-grown tissues and organs of *Allium sativum* L., *Physiology - In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.* 2012, 48, 411–416.
29. **Navneet K., Shuchi S., Simranjeet K., Haesh N.** Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? *Archive of Agronomy and Soil Science.* 2014, 12, 60, 1593–1624.
30. **Avila FW., Yang Y., Faquin V., Ramos SJ., Guilherme LR., Thannhauser TW., Li L.** Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium biofortified Brassica sprouts. *Food Chemistry.* 2014, 165, 578–586.
31. **Elguera J. C. T., Barrientos E. Y., Wrobel K.** Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2012, 35, 2, 431–441.
32. **Ardebili N. O., Saadatmand S., Niknam V., Khavari-Nejad R. A.** The alleviating effects of selenium and salicylic acid in salinity exposed soybean. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2014, 36, 3199–3205.
33. **Ožbolt L., Kreft S., Kreft I., Germ M., Stibilj V.** Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chemistry.* 2008, 110, 691–696.
34. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Journal of Plant Physiology.* 1962, 473, 15.
35. **Reisenauer R.** *Metody matematické statistiky a jejich aplikace.* Praha, 1970, 78–81.
36. **Klemra P., Klemrová V.** *Základy aplikované statistiky pro studenty farmacie.* Praha : Karolinum, 1997, 23–27.
37. **Sojková K.** *Možnosti ovlivnění produkce sekundárních látek v in vitro kulturách léčivých rostlin.* Farmaceutická fakulta v HK, rigorózní práce, 2014.

38. **Kačírková H.** *Kultury léčivých rostlin in vitro IX.* Farmaceutická fakulta v HK, diplomová práce, 2010.
39. **Adamová E.** *Silybum marianum in vitro - abiotická elicitace.* Farmaceutická fakulta v HK, diplomová práce, 2011.
40. **Cinková L.** *Kultury léčivých rostlin in vitro – XVII.* Farmaceutická fakulta v HK, diplomová práce, 2015.
41. **Sedláčková V.** *Kultury léčivých rostlin in vitro – XVI.* Farmaceutická fakulta v HK, diplomová práce, 2014.
42. **Kunzová L.** *Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů kultury Silybum marianum in vitro.* Farmaceutická fakulta v HK, rigorózní práce, 2009.
43. **Sigma-Aldrich.** Liquid Chromatography & HPLC, Supelco Reporter. [Online] [Citace: 28. 11 2015.] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/the-reporter/2011-liquid-chromatography.html>.
44. **Strnad M.** Fyziologie stresu. *Fyziologie rostlin – výukové materiály.* [Online] 2015. [Citace: 3. 3 2016.] <http://www.rustreg.upol.cz/cs/pro-studenty/materialy/fyziologie-rostlin-lrr-frp-lrr-fzrsb/>.