UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

Cecílie Šmolíková

Stabilita vakuol izolovaných ze suspenzních kultur *Scutellaria baicalensis Georgii*

(Diplomová práce)

Datum zadání: 20. 12. 2006
Datum odevzdání: 15. 5. 2008
Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.
Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.
Oponent:

„Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Děkuji svému školiteli PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, vytvoření přátelské pracovní atmosféry a trpělivost v průběhu celého vytváření mé diplomové práce. Děkuji také katedře farmakognozie za ochotu pomoci a přístrojové zabezpečení experimentální části diplomové práce.

Cecílie Šmolíková

OBSAH

1.ÚVOD…….. 5
2.CÍL PRÁCE……... 7
3. TEORETICKÁ ČÁST……... 8
3.1. Botanický popis rostliny……... 8
3. 2. Droga a její užití……..... 8
3. 3. Obsahové látky……..... 9
3. 3. 1. Biologické účinky……..... 10
3. 4. Explantátové kultury…… …….. 12
3. 4. 1. Kultivace explantátových kultur…….. 14
3. 5. Vakuoly…….. 15
3. 5. 1. Vakuoly a prevakuolární části……..……... 15
3. 5. 2. Transport přes tonoplast…….. 17
3. 5. 3. Metodika izolace vakuol……..…… 18
3. 5. 4. Purifikace vakuol……..... 20
3. 5. 5. Neutrální červeň…….. 20
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST……...…… 22
4. 1. Použité chemikálie a přístroje……. 22
4. 1. 1. Chemikálie…….. 22
4. 1. 2. Přístroje a chromatografické doplňky……..……... 23
4. 1. 3. Živné médium……..... 23
4. 1. 4. Kultivace a pasážování suspenzních kultur *S. baicalensis*…….. 24
4. 1. 5. Pasážování……... 24
4. 1. 6. Izolace vakuol ze sunpenzních kutur šišáku bajkalského……..…….. 25
4. 1. 7. Čištění vakuol…….. 26
4. 1. 8. Stabilita vakuol……..... 27
4. 2. HPLC analýzy……..... 27
4. 2. 1. Příprava vzorků……...…… 27
4. 2. 2. HPLC analýza vzorků……..... 28
4. 2. 3. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu……..…… 29
4. 2. 4. Validace HPLC analýzy……..…… 33
5. VÝSLEDKY...……..... 35
6. DISKUZE…….. 41
7. ZÁVĚR…….. 43
8. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA……..…… 44
9. POUŽITÁ LITERATURA…… 45

1. ÚVOD

Léčivé rostliny obsahují ve svých morfologických orgánech organické sloučeniny schopné určité choroby léčit, předcházet jim nebo zmírňovat jejich průběh. Tyto rostliny se používají k přímému léčení v čerstvém nebo konzervovaném stavu jako tzv. vegetabilní drogy tj. usušené nebo jiným způsobem konzervované rostliny či jejich části, určené k podání člověku nebo zvířeti k léčení, mírnění, prevenci nebo k stanovení diagnózy choroby, případně tělesné abnormality, nebo jejích symptomů. Slouží též jako surovina k výrobě čistých léčivých látek, případně jsou zpracovávány do různých léčivých přípravků.(1)

Říká se, že jedním způsobem se rodíme a tisícerým umíráme. Už prvobytný člověk trpěl různými nemocemi, které mu zkracovaly život. Ale protože se živil tím, co mu poskytovala okolní příroda, postupně poznával vlastnosti rostlin. Léčivé rostliny používal k léčení svých nemocí, ty škodlivé k snadnějšímu lovu zvěře, případně k ničení nepřátel. Číňané snižovali horečky výtažkem z kořene čang-šán už před 3000 lety. Účinek opia byl znám už ve starém Egyptě. Jihoameričtí Indiáni léčili zimnici rozemletou kůrou chinovníku už před španělskou okupací. V Indii léčili své duševně choré výtažkem z kořene rostliny *Rauwolfie*, z kterého bylo získáno v roce 1950 známé hypotenzivum reserpin. Dnes lidoví léčitelé připisují některým rostlinám účinky, které rostliny nemají a nemohou mít a používají je proti všem možným nemocem.(2,3)

Rostliny člověk využívá přímo jako potravu (obilniny, okopaniny, zelenina aj.) nebo nepřímo ve formě potravy živočišného původu (maso, vejce, mléko, olej aj.). Navíc rostliny obsahují pro člověka nezbytnou vlákninu a především vitamíny, které nejsou účinné jako živiny, ale jako katalyzátory a jejich nedostatek vede ke specifickým onemocněním avitaminóza.(4)

V neposlední řadě jsou rostliny významné pro obsah sekundárních metabolitů, které mohou mít výrazné farmakologické efekty. Příklady využití sekundárních metabolitů jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Význam sekundárních metabolitů pro člověka[5]

Sekundární metabolit	Účinek	Producent
Ajmalicin	Vasodilatans	*Catharanthus roseus*
Antrachinony	Meziprodukty pro syntézu kancerostatik	*Morinda citrifolia, Cassia tora*
Diosgenin	Steroidní hormony	*Discorea deltoidea*
Ginsenosidy	Adjuvans, tonikum	*Panax ginseng*
Chinin	Antimalarikum	*Cinchona ledgeriana*
Kodein	Analgeticum	*Papaver somniferum*
Kofein	Stimulans, kardiotonikum	*Camelia sinensis, Coffea arabica*
Morfin	Analgeticum	*Papaver somniferum*
Reserpin	Antihypertensivum	*Rauwolfia sp.*
Thebain	Syntéza morfinových alkaloidů	*Papaver bracteatum*
Ubichinon - 10	Kardiotonikum	*Nicotiana tabacum*
Vinkristin	Antileukemikum	*Catharanthus roseus*
Visnagin	Kardiotonikum	*Ammi visnaga*

2.CÍL PRÁCE

Moje diplomová práce s názvem „Stabilita vakuol izolovaných ze suspenzních kultur *Scutellaria baicalensis Georgii*“ se zabývá tématem kultivace explantátových kultur šišáku bajkalského a stabilitou vakuol z nich izolovaných. Cílem práce bylo:

1) Seznámit se s publikacemi pojednávajícími o daném tématu
2) Zvládnout kultivaci suspenzních kultur *Scutellaria baicalensis*
3) Zvládnout izolaci vakuol z těchto suspenzních kultur
4) Vyvinout metodiku oddělení vakuol od nečistot přítomných i po izolaci vakuol z rostlinného materiálu
5) Experimentálně stanovit stabilitu vakuol v různých roztocích

3. TEORETICKÁ ČÁST

3. 1. Botanický popis rostliny

Scutellaria baicalensis Georgii, šišák bajkalský je vytrvalá bylina s plazivým oddenkem, který je součástí tradiční medicíny jihovýchodní Sibiře. Patří do čeledi *Lamiaceae* (hluchavkovité) a má všechny základní znaky skupiny. Lodyhy jsou čtyřhranné, bohatě se větví a jsou vystoupavé až poléhavé. Listy jsou křižmostojné, jednoduché, celokrajné a kopinaté, na dotyk tuhé a kožovité. Kořen je vřetenovitý, na povrchu hnědý, na řezu žlutý, asi 2 cm tlustý. Koruna je zřetelně dvoupyská. Na bázi je prohnutá vzhůru, spodní pysk je dvoulaločný, horní přilbovitý a chlupatý. Kalich má nahoře dutý štítkovitý přívěsek (*scutellum*), který je dobře patrný i u plodu. Šišák kvete koncem léta a na podzim nápadně modrými až fialovými květy, které jsou uspořádány do koncových jednostranných hroznů délky 7 – 15 cm. Plodem je černohnědá, drobná, diskovitá tvrdka.

Šišák bajkalský se původně vyskytuje v lesostepních oblastech Zabajkalí, na středním toku Amuru (Rusko), v Severní Koreji, Číně, severovýchodním Mongolsku a v Japonsku. Roste na otevřených, suchých a kamenitých stanovištích s přímým sluncem nebo v polostínu. I v našich podmínkách se dá bez problémů pěstovat, nevyžaduje zvláštní péči a dobře přezimuje.[4,6]

3. 2. Droga a její užití

Droga *(Scutellariae radix*) se získává z kořenů tříletých, nebo čtyřletých rostlin sbíraných na jaře nebo na podzim. Po očištění, odstranění zevní hrubé vrstvy a rozkrájení na menší kousky se suší v suchých místnostech přírodním nebo umělým teplem. Tradiční čínská medicína využívala šišáku při hypertenzi spojené s přehřátím, proti krvácení z nosu, vnitřnímu krvácení, při zánětech v krku, kašli, zvracení, silné menstruaci, kožních infekcích, také při záškrtu, spále a hepatitidě. Je také součást tzv. san chuang zhe she ye – směsi "tří žlutých bylin", kde je kombinován s *Coptis chinensis* a *Phellodendron amurense*, tato směs se používá tradičně při žaludečních, prsních a močových infekcích.[7]

Dnes jsou kořeny této rostliny užívány jako antipyretika, antihypertenziva, antiflogistika, antialergika, sedativa a mírná hypnotika. Šišák bajkalský též slouží při odstraňování subjektivních symptomů, jako jsou bolesti hlavy a bolesti v oblasti srdce. Droga se užívá nejčastěji jako odvar, případně se z ní připravuje lihový extrakt. Denní dávka pro přípravu odvaru je 6 až 15 g, lihový extrakt (60 až 80 g drogy na 1 litr 40 % lihu) se užívá 4krát denně 1 polévkovou lžíci po dobu šesti týdnů.[8] Vedlejší účinky drogy nebyly zatím poznány.

3. 3. Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami této rostliny jsou flavonoidy. Jsou přítomny hlavně ve formě glykosidů jako glukuronidy, méně často jako glukopyranosidy. Liší se od sebe různým počtem a postavením hydroxylových a methoxylových skupin. Celkem jich bylo v této rostlině identifikováno přes čtyřicet.

Obsah jednotlivých flavonoidů kolísá v rostlině s ročním obdobím i lokalitou sběru, nejvyšší obsah však vždy bývá u flavonoidu baicalinu (viz obrázek č. 1).[9] V kořeni je ho 12 – 17 %. Některé zdroje však uvádí podstatně nižší obsah - 4,3 %. Jeho aglykonem je baicalein.[10]

V mnohých lokalitách je šišák součástí tradiční medicíny. Fytochemický výzkum prokázal více než 200 látek typu iridoidů, diterpenových kardenolidů, flavonoidů (methoxyflavonů a tetrahydroxyflavonů), triterpenů aj.[11]

Flavonoidy jsou deriváty fenylchromanu. V rostlinách se vyskytují jako aglykony i jako glykosidy (-0 nebo –C). Základní skelet flavonu, flavanonu, dihydroflavonolu, flavonolu a isoflavonu může být různě substituovaný, nejčastěji hydroxylovými a metoxylovými skupinami.[12]

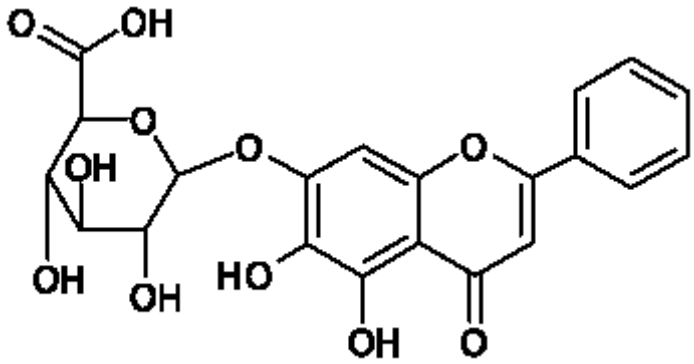
V Číně je kořen šišáku bajkalského oficinální a je jednou z nejčastěji užívaných drog k léčení bakteriálních infekcí dýchacího a trávicího traktu. Je také užíván v Japonsku (wogon) čistý nebo ve směsích. Obsahuje přes 30 flavonoidů v širokém rozmezí koncentrací.[13]

Významnými flavonoidními glykosidy jsou i wogonosid a scutellarin a jejich aglykony wogonin a scutellarein. Mezi další flavonoidy a isoflavonoidy pak patří oroxylin A, oroxylin A -7-O-glucuronid, scullcapflavon I a scullcapflavon II,

neobaicalein, dihydrobaicalin, dihydrooroxylin, dihydrooroxylin A, norwogonin, isowogonin, huangqin, carthamidin, isocarthamidin a další. (14)

Z ostatních látek mimo flavonoidů byl v šišáku prokázán obsah lignanového glykosidu, sesquilignanových glykosidů, silic, sitosterolů a aminokyselin. (15)

Obrázek č. 1: Struktura baicalinu



3. 3. 1. Biologické účinky

Farmakologické výzkumy potvrdily, že za pozitivní vliv drogy na celou řadu onemocnění jsou odpovědné flavonoidy. Zejména baicalin, jeho aglykon baicalein a wogonin mají významné účinky odpovídající tradičnímu používání drogy. Flavonoidy z rostliny *Scutellaria baicalensis Georgii* jsou skupinou látek s velmi širokou škálou biologických účinků. Především mají prokazatelnou protizánětlivou, antioxidační, antihypertenzivní, antibakteriální a antivirovou aktivitu. Mohou být využity pro podpůrnou léčbu hypertenze, aterosklerózy, prevenci vzniku trombóz, pro léčbu některých infekčních chorob, včetně AIDS. Velmi perspektivní se podle nejnovějších studií jeví použití baicaleinu proti nádorům prostaty, prokazuje také pozitivní efekt i proti některým typům rakoviny prsu a melanomů.(16,17,18)

Použití izolovaných flavonoidů v humánní medicíně je předmětem dalších výzkumů a klinicko-toxikologických testů.

Protizánětlivý a antihypertenzní účinek

Tyto dva účinky spolu vzájemně souvisí a jsou způsobeny stejným základním mechanismem - inhibicí enzymu lipoxygenasy.

Bylo prokázáno, že baicalein selektivně inhibuje 5- a 12-lipoxygenasu.[19,20] Tímto způsobem blokuje oxidaci kyseliny arachidonové na 12-HPETE, 12-HETE (hydroperoxyeikosatetraenové kyseliny). Tím zabraňuje syntéze leukotrienů a nepřímo podporuje produkci prostaglandinu PGI_2. Jako inhibitor lipooxygenasy je baicalein využíván v řadě biochemických experimentů, zejména výzkumu kardiovaskulárního systému. Snižuje množství aktivovaného endothelinu-1, který je významným vasokonstriktorem a je schopen blokovat zvýšenou inkorporaci leucinu do srdečních fibroblastů, která obvykle předchází hypertrofii myokardu při hypertenzi.[21,22,23,24,25]

U flavonoidu wogoninu bylo zjištěno, že kromě inhibice lipooxygenasy se na jeho protizánětlivém účinku podílí také schopnost inhibovat expresi MCP-1, proteinu účastnícího se zánětu jako chemotaktický faktor pro monocyty. Dále tento flavonoid ovlivňuje i produkci oxidu dusnatého v organizmu, potlačením genové exprese enzymu iNOS (inducibile nitric oxide synthase).[26,27,28,25]

Antioxidační účinek a vychytávání volných radikálů

Volné radikály jsou látky schopné přímo poškozovat bílkoviny, nukleové kyseliny a lipidy. Iniciují peroxidaci lipidů, což vede k narušení buněčných membrán a organel. Vzniklé peroxidy pak působí stejně jako původní volné radikály.[29] Studie prokázaly, že účinek baicalinu a baicaleinu na inhibici peroxidace lipidů je asi 375 krát vyšší než účinek vitamínu E použitého jako standard[30], přičemž účinek wogoninu a wogonosidu je podstatně nižší. Tyto dva flavonoidy však blokují vznik některých látek iniciujících vznik volných radikálů.[31]

Antibakteriální a antivirová aktivita

Z tradičního léčitelství, kdy se droga používala proti zánětům krčních mandlí a dutiny ústní se vyvinul zájem studovat účinky jejích obsahových látek na bakterie a viry. Zjistilo se, že nejúčinnější je baicalin, jenž je aktivní zejména proti chřipkovým virům a *Staphylococcus aureus.* Wogonin byl v pokusech *in vitro* účinný proti viru hepatitidy B a proti RSV (respiratory syncitial virus).

Cytostatický a imunomodulační účinek

Baicalein je pro svoji malou toxicitu a velkou účinnost perspektivní látkou pro prevenci rakoviny a pro její léčbu v ranných stadiích.[32] Tento účinek je kombinací dvou již výše zmíněných vlastností-antioxidační aktivity a antivirového působení v případě virové etiologie rakovinného onemocnění (např. Epstein-Baar virus).[33]

3. 4. Explantátové kultury

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů kalusů. Explantátové kultury (název tkáňová kultura není přesně výstižný) se využívají jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů.

Hlavní výhodou explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk, a z každé lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Explantátové kultury umožňují též konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin. Vegetativní množení rostlin v explantátových kulturách je možné díky totipotenci rostlinné buňky, což znamená, že i diferencované rostlinné buňky obsahují veškerý genetický materiál potřebný pro regeneraci celé rostliny.

Metodologie explantátových kultur v podstatě využívá mikrobiologických technik a biotechnologických procesů založených na mikroorganizmech. Existují však rozdíly mezi kultivacemi mikroorganizmů a rostlinných buněk.

Kultivace explantátových kultur probíhají delší dobu, jsou citlivější na střižné síly při mechanickém míchání, pro selekci a stabilizaci určitých genotypů se používají komplikovanější postupy a živné půdy jsou dražší.

Prvým úkolem je získat stabilní vysokoprodukční explantátové kultury sestávající z jednotlivých buněk nebo jejich několikačetných agregátů. Explantátová kultura se získá z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou živnou půdu a inkubací v teplotním rozmezí 23 až 28ºC. Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu.

Obsah růstových látek a vitamínů v živné půdě má rozhodující význam nejen pro růst kalusové kultury, ale i pro převádění kalusu do suspenzní kultury. Zejména rozpadavý kalus po přenesení do tekuté živné půdy zajišťuje homogenitu suspenzní kultury, která je pro další vývoj postupu nezbytná. Homogenní kultura v tomto případě znamená, že obsahuje kromě jednotlivých buněk i shluky dvou až několika buněk.

Pro izolaci vysokoprodukčních kmenů se s úspěchem využila mutageneze, dále růst v přítomnosti různých chemických látek, např. analogů aminokyselin, které usmrcují divoké buňky a zvýhodňují regulační mutanty.

Obecně lze říci, že pro selekci lze použít techniky a metody, které se osvědčily v mikrobiologii. Kromě tradičních genetických metod se v současnosti využívají moderní metody spočívající v zavedení cizorodé DNA do rostlinné buňky:

a) přímou transformací fragmenty DNA,
b) použitím virů jako vektorů,
c) konstrukcí minichromozomů a jejich zavedení do buňky,
d) použitím onkogenních plazmidů *Agrobacterium tumefaciens* jako vektorů,
e) použitím eukaryontních mobilních elementů jako vektorů.[34]

3. 4. 1. Kultivace explantátových kultur

Volba vhodného kultivačního zařízení má pro přípravu explantátových kultur rostlinných buněk značný význam, neboť při kultivacích ve větších objemech se rostlinné buňky liší od mikrobních buněk zejména vysokou zdánlivou viskozitou buněčných suspenzí spojenou s citlivostí ke střižným silám v důsledku značného buněčného objemu. Při šetrném, avšak nedostatečném způsobu promíchávání explantátové kultury mohou být metabolické procesy limitovány kyslíkem a kromě toho vzniká trvalý třífázový systém v důsledku nadměrné sedimentace nebo flotace buněk. Vhodným zařízením jsou pomaloběžné rollery nebo plastikové vaky umístěné na pomaloběžném třepacím stroji.

Doposud nevyřešenou otázkou je dlouhá generační (kultivační) doba explantátových kultur. Střední generační doba u mikroorganizmů se většinou pohybuje v desítkách minut, u kořenových meristémů rostlin, kde probíhá dělení buněk nejrychleji, trvá jeden buněčný cyklus 10 až 35 h. Buněčný cyklus u explantátových kultur je pomalejší a pohybuje se v nejlepším případě od 15 h výše. Důsledkem je značně dlouhá doba kultivace, a tím zvýšené nároky na udržení sterility procesu. Hlavním úkolem je nalezení takových způsobů kultivace, zejména z hlediska složení živné půdy (nové auxiny), které by urychlily růst a množení buněk.

Využití explantátových kultur

Explantátové rostlinné kultury se uplatní zejména jako:

a) Alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře. Předností je možnost vést proces za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. Výsledné produkty jsou po kvalitativní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur.

b) Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.

c) Získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk. Z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny.

d) Produkty biotransformací, kdy z poměrně levných a dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky, protože příslušné enzymy se u mikroorganizmů nevyskytují. [34]

3. 5. Vakuoly

3. 5. 1. Vakuoly a prevakuolární části

Ve většině buněk z vegetativních tkání rostlinného těla zabírá centrální vakuola velkou část objemu a je nepostradatelnou součástí organismu. Mezi mnohé funkce této organely patří udržení turgoru, udržení protoplazmatické homeostázy, skladování metabolických produktů, vylučování xenobiotik a trávení cytoplazmatických součástí.

Donedávna byly znalosti o biosyntéze a významu vakuol založeny velkou měrou na morfologických pozorováních. Prudké technologické pokroky za posledních několik let posunuly poznání vakuolární biogeneze až k molekulární úrovni. Domácí vakuolární proteiny rovněž jako proteiny určené pro degradaci jsou do vakuoly doručeny vylučovací cestou, která zahrnuje biosyntetické, autofágní a endocytotické transportní cesty. Základní mechanismus, který organizuje tyto cesty v eukaryotech je vysoce zachovaný napříč kmeny.[35,36]

Biogeneze vegetativních vakuol

V rostlinných buňkách stejně jako v živočišných buňkách a kvasnicích začíná anterográdní transport nově syntetizovaných rozpustných látek v ER. Většina rozpustných proteinů určených pro vakuolu je syntetizována polyzómy spojenými membránou. Nejprve ve formě prekurzorů. Vznikající prekurzorová podoba je zacílena do lumen ER. Po jejich kotranslační translokaci napříč membránou ER jsou sekreční proteiny složeny a vystaveny časné potranslační modifikaci. ER domácí proteiny napomáhají nově syntetizovaným polypeptidům v získání jejich správné konformace.[37] Proteiny které nedosáhly správné trojrozměrné struktury, jsou časem degradovány. Degradovány jsou i ty, jenž nebyly řádně složeny v ER a dodány zpět do cytosolu reverzní translokací napříč ER.[38]

Stavba a funkce vakuol

Systém vakuol v buňce se nazývá vakuom. V mladých dělivých buňkách bývají četné drobné vakuolky, jejichž obsah je spíše rosolovitý. Později navzájem splývají a zvětšují se a jejich obsah stále více vodnatí (obsahuje 90 % i více vody). Cytoplazma i s jádrem bývá zatlačena ke stěnám buňky (nástěnná cytoplazma) nebo zůstává jádro obalené tenkou vrstvou cytoplazmy, ve středu a s nástěnnou cytoplazmou je spojují tenké plazmatické provazce. Obsah vakuoly je od cytoplazmy ostře ohraničen polopropustnou plazmatickou membránou – tonoplastem. Ten je sídlem aniontových transportních systémů a systémů pro transport organických látek. Tonoplast je dobře permeabilní pro kationy (zvláště K^+), proto se vyrovnává nadbytek organických kyselin ve vakuole právě pasivní distribucí K^+ iontu z cytoplazmatického prostoru. Tedy ve vakuole se hromadí ve zvýšeném množství jak anionty, tak kationy, které je potom doprovázejí, a tím celková koncentrace bude vyšší než v cytoplazmě a než ve vnějším prostředí. To vyvolává jevy, které vedou k osmotickým efektům v rostlinné buňce. Výsledkem toho je stav, že jak za kationy, tak za anionty se vyměňují iontové produkty vody (H^+,OH^- + CO_2 =HCO_3^-), které vyloučeny z buňky se opět vrací do nedisociované podoby vody. Z buňky ven se vylučují sumárně voda a dovnitř vstupují soli. Soli mají osmotickou aktivitu, zatímco molekuly rozpouštědla ne. Vzniká tedy neustále přetlak osmoticky aktivních látek uvnitř rostlinné buňky, a tím dochází k intenzivnímu nasávání vody, zvětšuje se její objem a stoupá turgor. To vyžaduje existenci pevné stěny buněčné s určitou elasticitou.

Obsah vakuol: buněčná šťáva je vodný roztok různých produktů látkové přeměny rostlin buď zásobního nebo odpadního charakteru. V jediné buňce se mohou vyskytovat i vakuoly různě specializované (např. s buněčnou šťávou zbarvenou antokyanem i s bezbarvou). Častější než specializace vakuol je však specializace buněk, které pak obsahují vakuoly s určitým obsahem. Takové specializované buňky se nazývají idioblasty. Velmi často obsahují vakuoly barviva a také jiné látky s velkým významem např. pro potravinářský průmysl nebo zdravotnictví.[6]

Rostlinné vakuoly jsou složité a dynamické (rozpínavé) organely. Byly učiněny důležité kroky v porozumění transportérům přítomným v tonoplastu a

molekulárním interakcím, které dovolují cílení do vakuol. Přesto ještě nebyly zjištěny znaky, které by jednoznačně definovaly vakuolu.

Rostlinné vakuoly jsou morfologicky a funkčně různé organely a poslední zprávy potvrdily, že existují různé druhy rostlinných vakuol. Některé slouží jako skladovací organely, jiné jako lytické kompartmenty. Funkce vakuoly závisí na souboru rozpustných látek a na bílkovinách spojených membránou. Tyto jsou specificky upraveny na míru pro každý typ buňky.(39)

Hlavní překážka k porozumění rostlinným vakuolám je nedostatek specifických znaků pro tyto organely a jiné endomembránové součásti. Pohled na rostlinné vakuoly a prevakuolární části není jasný, protože spolehlivé znaky nejsou dostupné a smluvené.

Zvláštní pozornost je zaměřena na integrální membránové transportéry v tonoplastu a měchýřkovitou dopravu proteinů do vakuoly. (40)

3. 5. 2. Transport přes tonoplast

Tonoplast je označení pro biologickou membránu, která obklopuje obsah vakuoly. Strukturálně je v zásadě obdobná jako cytoplazmatická membrána, má však lehce specifické složení. Má trochu jiné zastoupení jednotlivých druhů lipidů v lipidové dvouvrstvě oproti membránám jiného typu a obsahuje pro vakuolu (tedy pro tonoplast) specifické bílkoviny. Mnoho biologických procesů, zajišťovaných vakuolou, začíná interakcí látek z cytoplazmy s povrchem tonoplastu, tonoplast proto musí být od membrán jiných organel odlišitelný, odlišné zastoupení bílkovin a lipidů, které je pro tonoplasty vždy specifické pak takovouto identifikovatelnost skutečně zabezpečuje. Díky tomu, že může být vakuola chemicky rozeznána, může být žádoucí protein nebo obsah transportního váčku dopraven specificky do ní, bez rizika, že skončí v jiné organele.(41)

Mechanizmy, kterými se různé chemické látky dostanou do vakuoly, jsou již nějakou dobu předmětem zkoumání. Předpokládají se tyto mechanizmy:

- transport vody pomocí „aquapórů“ TIPs (tonoplast-intrinsic proteins), které můžou navíc v některých případech transportovat i malé molekuly jako močovinu a glycerol [42]
- vakuolární H^+-ATPáza a H^+-PPáza (H^+- pyrofosfatáza), které fungují jako protonové pumpy tvořící elektrochemický gradient použitelný dalšími transportéry [42,43]
- ABC transportéry (ATP binding cassette), které využívají energii z ATP, jsou proto citlivé k inhibitorům ATPáz (např. vanadát), ale nezávislé na membránovém potenciálu a pH gradientu [43,44]
- další transportní systémy ve vakuolární membráně přenášející ionty nezbytné pro rostliny jako Ca^{2+} a Na^+, které fungují jako protonové antiporty (Ca^{2+}/H^+, Na^+/H^+) [42]

3. 5. 3. Metodika izolace vakuol

Jednotlivé druhy rostlinných buněk se liší v tom, jaké mají vakuoly (tvar, velikost vakuol) a tudíž se liší i metody, jakými jsou z nich vakuoly izolovány

V literatuře se objevuje větší množství izolačních postupů:

Metoda podle Roger A.Leigha využívající metrizamidového gradientu

Pro izolaci byl použit kořen rostliny *Beta vulgaris L.*– řepa červená. Nejprve bylo odříznuto z kořene zásobní pletivo a podrobeno plazmolýze. Poté bylo pletivo rozkrájeno na 20 kusů, vakuoly byly z pletiva vypláchnuty na podložní sklíčko, překryty krycím sklíčkem a pozorovány. Byly pořízeny 3 různé snímky a zaznamenán počet vakuol. Tento postup se ukázal být vhodným pro zásobní pletivo řepy, takže je možné ho použít v průmyslovém měřítku, ale je nevhodný pro jiná pletiva. [45]

Metoda podle Randi Kringstada a spol. využívající ficollový hustotní gradient

Pro izolaci byly použity listy rostliny *Sedum telephium L.* -rozchodník veliký. Po enzymatickém rozložení buněčných stěn a 30 minutovém odstřeďování na ficollovém gradientu se daly rozeznat čtyři frakce. První zlomek, který zůstal na vrchu gradientu, obsahoval resuspendovaný pufr a rozpustný obsah rozpadlých protoplastů a vakuol. Druhý zlomek se skládal z velké skupiny vakuol v rozhraní od 5 do 10 % ficollu. Třetí zlomek lokalizovaný v rozhraní od 10 k 15 % ficollu obsahoval vakuoly znečištěné celými protoplasty a úlomky držící se vnějšku tonoplastu. Poslední zlomek obsahoval usazeninu několika nedotčených buněk a většiny cytoplazmatických organel zahrnující chloroplasty, mitochondrie a peroxizómy. (46)

Metoda podle M. Kleina

K pokusům byla použita nadzemní část brokolice zbavená květenství a periferních částí s vyšším obsahem cévních svazků. Po homogenizaci a rozložení buněčných stěn byla výsledná suspenze protoplastů filtrována a podrobena lýze cytoplazmatických membrán. Uvolněné vakuoly byly zakoncentrovány pomocí roztoku skládajícím se z lyzátového media a 1,5 % ficollu 400. Výtěžek vakuol byl okolo 25 %. Podrobnou analýzou bylo odhaleno znečištění vakuolární frakce protoplasty, kterých bylo okolo 4 %. Brokolicové vakuoly byly schopné udržovat ATP -gradient přes tonoplast.(47)

Metoda A. Contina

Buňky ze suspenzních kultur *Catharanthus roseus* byly omyty roztokem manitolu a vloženy do roztoku enzymů lyzujících buněčnou stěnu. Uvolněné protoplasty byly filtrovány přes tkaninu Miracloth a zcentrifugovány. Po lýze cytoplazmatické membrány byl použit 8 %ní ficollový roztok k oddělení vakuol. Po opakované centrifugaci v tomto roztoku při 200 g byly vakuoly zakoncentrovány v horní části roztoku, zatímco nezlyzované protoplasty a další buněčné části byly sedimentovány. Kvalita izolovaných vakuol byla

zkontrolována mikroskopem s Evansovou modří a neutrální červení, cytoplasmatické znečištění bylo zviditelněno fluoresceinem.[48,49]

3. 5. 4. Purifikace vakuol

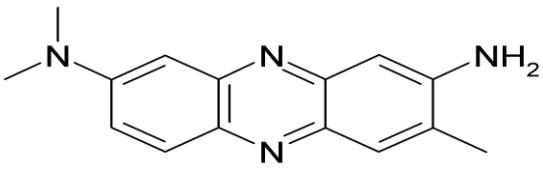
Metoda podle Lynn E. Vaughn a Rowlanda H. Davise

Purifikace probíhala pomocí ultracentrifugace přes hustotní gradient. Homogenáty byly centrifugovány po dobu 5 minut při 600 g, tímto byl odstraněn buněčný odpad a zbytky buněčných stěn. Supernatanty filtrované přes Miracloth byly centrifugovány při 15 000 g po dobu 20 minut, aby byla získána organelová peleta (P 15 000). P 15 000 byla suspendována v 0,2 až 1 ml TES-NaOH pufru a vystavena novému hustotnímu gradientu. Suspenze byla centrifugována po dobu 3 hodin při 100 000 g ve 30 až 60 % (m/m;1 až 2,5 M) sacharózovém gradientu. Vakuoly vytvořily peletu v tomto gradientu a byly čisté.[50]

3. 5. 5. Neutrální červeň

Neutrání červeň je barvivo poměrně malé molekulární hmotnosti (288,783), které proniká buněčnými membránami živých buněk. Její molekuly nemají elektrický náboj, ale nízké pH uvnitř vakuol je přeměňuje do iontového stavu neschopného pronikání tonoplastem, kde barvivo zůstává uskladněno, neutrální červeň se tak hromadí ve vakuole a je užívána, aby poskytovala kontrast k protoplastu.[51] Byla užívána k pozorování plazmolýzy rostlinných buněk v různých roztocích.[52] Pro barvení neutrální červení byla získána bramborová šťáva mícháním syrových brambor v odstředivce a podrobení obsahu tepelné inaktivaci a filtraci. Barvivo bylo pak přidáno k této šťávě. Užité barvivo mělo konečnou koncentraci ve šťávě vypočtenou na 0,05 %. Ideání čas na zapuštění barviva pro dobrou viditelnost na snímcích byl zhruba 15 minut. Plátky byly řezány ručně a po barvení byly ponořeny do vodných roztoků sacharózy (5, 10, 20, 30, 40 a 50 %) na minimálně 60 minut.[53]

Obrázek č. 2: Struktura neutrální červeně a její zbarvení měnící se podle pH[54]



Neutral red (pH indicator)		
below pH 6.8		*above pH 8.0*
6.8	↔	**8.0**

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. 1. Použité chemikálie a přístroje

4. 1. 1. Chemikálie

-methanol pro HPLC: Fluka, Buchs;
-kyselina α-naftyloctová č., myoinositol puriss.: Sigma, St.Luis;
-enzymatický hydrolyzát kaseinu: Imuna, Šarišské Michalany;
-celuláza „Onozuka R-10“ z Trichodermy viride: SERVA, Heidelberg;
-macerozyme R-10: Duchefa Biochemie;
-hepes: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim;
-chlorid vápenatý dihydrát: Fluka, Buchs;
-chlorid hořečnatý hexahydrát: Fluka, Buchs;
-D-mannitol: Fluka, Steinheim;
-ficoll R 400: Fluka, Steinheim;
-polyethylenglycol 4000: Fluka, Steinheim;
-ethylendiamintetraoctová kyselina: Aldrich, Steinheim;
-chlorid thiaminia puriss., chlorid pyridoxinia puriss.: Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook Hampshire;
-baicalin č., baicalein č., sodium orthovanadate puriss.: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim;
-dihydrofosforečnan draselný č., dusičnan draselný p.a., neutrální červeň p.a., dusičnan amonný p.a., glycin č., hydrogenfosforečnan sodný p.a., chlorid kobaltnatý p.a., chlorid vápenatý p.a., jodid draselný p.a., kyanid draselný č., kyselina boritá p.a., kyselina o-fosforečná č., kyselina nikotinová č., methanol p.a., molybdenan sodný p.a., petrolether p.a., sacharóza p.a., síran hořečnatý p.a., síran manganatý p.a., síran měďnatý p.a., síran zinečnatý p.a., síran železnatý p.a.: Lachema, Brno;

4. 1. 2. Přístroje a chromatografické doplňky

-autokláv PS 20A, autokláv PS 121, horkovzdušný sterilizátor HS 81A: Chirana, Brno;
-analytické váhy A 200S: Sartorius, Göttingen;
-box s laminárním prouděním Fatran L-F: výrobné družstvo Pokrok, Žilina;
-vodní lázeň KL: Laboratorní přístroje, Praha;
-mikroskop Meopta standard: Meopta, Košíře;
-HPLC chromatograf JASCO (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055): Jasco International, Tokyo;
-chromatografická kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 μm) s předkolonkou: Merck, Darmstadt;
-chromatografická kolona Waters μBondpak C 18, 3,9×150 mm: Waters, Milford;
-třepačka CEROMAT MO: B. Braun Biotech International, Melsungen;
-centrifuga MLW T23: Electronic, Berlin;
-centrifuga MPW: Med. Instruments, Varšava;
-spektrofotometr CECIL CE 1010: Cecil instruments, Cambridge.

4. 1. 3. Živné médium

Kalusové kultury šišáku bajkalského byly kultivovány na půdě podle Murashigeho a Skooga, jejíž složení je následující:

$CaCl_2.2H_2O$	440,00 $mg.l^{-1}$
KNO_3	1900,00 $mg.l^{-1}$
$MgSO_4.7H_2O$	370,00 $mg.l^{-1}$
NH_4NO_3	1650,00 $mg.l^{-1}$
$KH_2PO_4.H_2O$	170,00 $mg.l^{-1}$
$FeSO_4.7H_2O$	27,84 $mg.l^{-1}$
Na_2EDTA	37,37 $mg.l^{-1}$
$MnSO_4.4H_2O$	22,30 $mg.l^{-1}$
$ZnSO_4.7H_2O$	11,50 $mg.l^{-1}$
H_3BO_3	6,20 $mg.l^{-1}$

KI	0,83 $mg.l^{-1}$
$CuSO_4.5H_2O$	0,025 $mg.l^{-1}$
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,025 $mg.l^{-1}$
$CoCl_2.6H_2O$	0,025 $mg.l^{-1}$
inositol	100,00 $mg.l^{-1}$
hydrolyzát kaseinu	1000,00 $mg.l^{-1}$
glycin	2,00 $mg.l^{-1}$
kyselina nikotinová	0,50 $mg.l^{-1}$
thiamin hydrochlorid	0,10 $mg.l^{-1}$
pyridoxin hydrochlorid	0,50 $mg.l^{-1}$
sacharóza	30000,00 $mg.l^{-1}$

Tato množství byla navážena na analytických vahách, látky potřebné v menším množství byly odpipetovány ze zásobních roztoků. Od 6. pasáže po testování vlivu rostlinných hormonů byla jako růstový stimulátor používána NAA v koncentraci 10 mg.l-1.

4. 1. 4. Kultivace a pasážování suspenzních kultur *S. baicalensis*

Suspenzní kultury byly odvozeny z 9. pasáže kultur kalusových mechanickým rozvolněním částí kalusů ve 25 ml MS média obsahujícího NAA (10 $mg.l^{-1}$). Kultivace probíhala v 250 ml kulatých baňkách s plochým dnem na rotační třepačce (120 ot/min). Byla použita 16 h světelná perioda a kultivační interval byl 12-14 dní. K vlastním experimentům byla použita 50-65. pasáž suspenzních kultur.

4. 1. 5. Pasážování

Pravidelné pasážování suspenzních kultur bylo prováděno v intervalu 12-14 dní v boxu s laminárním prouděním vzduchu, jehož vnitřní povrch byl předem omyt 96 % ethanolem a ozařován germicidní zářivkou. Při práci byly dodržovány zásady práce v aseptickém prostředí. Vlastní pasážování bylo

prováděno pomocí pipet, které byly předem sterilizovány po dobu 15 minut při 120ºC v autoklávu po vsunutí chomáčku vaty a obalení v hliníkové fólii.

4. 1. 6. Izolace vakuol ze suspenzních kultur šišáku bajkalského

Pro izolaci vakuol ze suspenzních kultur *S. baicalensis* byla použita metoda podle Šárky Ševčíkové.[59]

Rozpis:
Roztok A: 500 mM manitol
Roztok B: 500 mM manitol, 10 mM hepes o pH= 7, 45
Roztok 5 % ficollu 400: 500 mM manitol; 10 mM hepes o pH= 7, 4; 5 % ficoll 400
Roztok 10 % ficollu 400: 500 mM manitol; 10 mM hepes o pH= 7, 4; 10 % ficoll 400
Roztok 15 % ficollu 400: 500 mM manitol; 10 mM hepes o pH= 7, 4; 15 % ficoll 400
Roztok 2 % ficollu 400: 500 mM manitol; 10 mM hepes o pH= 7, 4; 2 % ficoll 400
Enzymatická směs: (1 % celluláza onozuka R-10, 0,3 % macerozyme R-10 a 0,5 % manitol)
Lyzační roztok: 150 mM manitol, 12,5 mM EDTA, 10 mM hepes, 0,0375 % PEG 4000)

Izolace protoplastů

Nejprve byly přefiltrovány suspenzní kultury šišáku bajkalského přes papírový filtr. Poté byly buňky dvakrát promyty roztokem A a znovu zfiltrovány přes papírový filtr. 18 g buněčné suspenze bylo v Erlenmayerově baňce smícháno s 50 ml enzymatické směsi a k této směsi byl přidán zásobní roztok neutrální červeně (NČ) tak, aby její výsledná koncentrace v roztoku byla 0,05 %. Neutrální červeň slouží k obarvení vakuol a jejich lepšímu pozorování pod mikroskopem. Baňka se směsí byla umístěna na třepačku při teplotě 25ºC. Po 2 hodinách třepání při (120 ot./min) byl pipetou odebrán na podložní sklíčko kontrolní vzorek a

pozorován pod světelným mikroskopem. V případě, že enzymatický rozklad nebyl dostatečný - většina buněk měla protáhlý tvar – byla prodloužena doba třepání na 3 hodiny. Poté byla již naprostá většina buněk zbavena buněčné stěny a uvolněné protoplasty měly přesně kruhový tvar.

Izolace vakuol

Směs byla rozlita do 2 centrifugačních zkumavek a centrifugována 10 minut při 2200 otáčkách. Supernatant byl odebrán a k usazenině do každé zkumavky bylo přidáno 5 ml roztoku B. Směs byla dostatečně promíchána. Obsah obou zkumavek byl slit do kádinky, k němu bylo přidáno 20 ml lyzačního roztoku a minimálně 2 minuty byl nepřetržitě míchán, aby došlo k lýze cytoplazmatické membrány. Lýza byla podpořena též několikanásobným nasátím a vypuštěním roztoku přes ústí pipety o objemu 5 ml. Mezitím bylo do dvou skleněných centrifugačních zkumavek odpipetováno po 8 ml 15 % ficollu 400, dále opatrně převrstveno 8 ml 10% ficollu 400, třetí vrstvou bylo asi 10 ml lyzátu. Na vrch lyzátu bylo opatrně přidáno 8 ml 5 % ficollu 400. Gradient byl 20 minut centrifugován při 2200 ot./min. Doba od přidání lyzačního roztoku po začátek centrifugace nesměla přesáhnout 12 minut.
Vakuoly se nacházely na povrchu 5 % ficollu 400 a to v množství velmi malém, za to ale neobsahovaly téměř žádné nečistoty. Ve vrstvě mezi 5 a 10 % ficollem 400 se vakuoly vyskytovaly hojně, ale s obsahem nečistot, z čehož plyne nutnost čištění vakuol před dalšími experimenty.

4. 1. 7. Čištění vakuol

Výsledný postup čištění vakuol popsaný níže je výsledkem vlastních experimentů, při kterých byla měněna koncentrace i množství ficollových roztoků.

K čištění byly odebrány všechny vrstvy od 10 % ficollu výše (tzn. 10 a 5 % ficoll 400), poté byl vytvořen nový gradient ficollů: 15 ml 10 % ficollu 400 bylo opatrně převrstveno roztokem vakuol z předchozího bodu a nakonec převrstveno 5 ml 2 % ficollu 400. Poté byla tato směs centrifugována při 2200 ot./min. po dobu 15 minut. Nečistoty zůstaly v usazenině, vakuoly se

shromažďovaly v supernatantu. Pak bylo odebráno vše kromě usazeniny a dolní vrstvy 10 % ficollu 400. Odebraný roztok byl centrifuován při 4000 ot./min. po dobu 15 minut. Vakuoly se usazovaly na dně. Sediment obsahoval čisté vakuoly. Supernatant byl odstraněn a vakuoly byly rozmíchány s roztokem pro uchovávání vakuol.

Rozpis roztoků pro uchovávání vakuol:
Roztok 5 % ficollu 400: 500 mM manitol; 10 mM hepes o pH= 7, 4; 5 % ficoll 400
100 mM NaCl: 0,292 g NaCl bylo rozpuštěno v 50 ml vody
200 mM NaCl: 0,584 g NaCl bylo rozpuštěno v 50 ml vody
Destilovaná voda
Roztok A (složení viz kapitola 4. 1. 6)
Roztok B (složení viz kapitola 4. 1. 6)

4. 1. 8. Stabilita vakuol

Byly testovány různé roztoky pro uchovávání vakuol, konkrétně byly testovány tyto roztoky: destilovaná voda, roztok 5 % ficollu 400-viz rozpis nahoře, 100 mM NaCl-viz rozpis nahoře, 200 mM NaCl-viz rozpis nahoře, roztok A a roztok B.
Vlastní postup: usazenina vakuol byla rozmíchána v příslušném roztoku (množství cca 10 ml) a výsledný roztok byl uložen do lednice o teplotě 4ºC. Poté byl postupně v intervalech 0 h, 18 h, 24 h, 48 h odebírán vzorek o objemu 2 ml.

4. 2. HPLC analýzy

4. 2. 1. Příprava vzorků

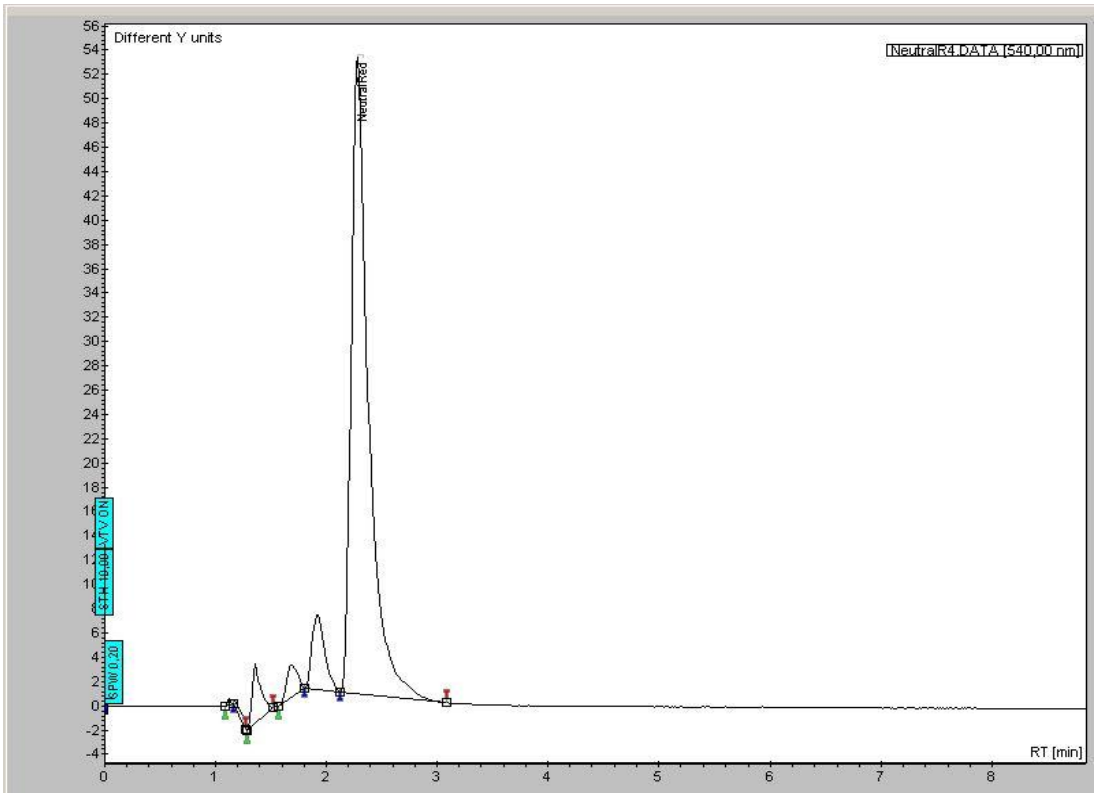
Odebraný roztok vakuol o objemu 2 ml byl centrifugován při 4000 ot./min. po dobu 10 minut. Analyzován byl jak supernatant, tak sedimentované vakuoly. Supernatant byl přímo odebrán do vialky a analyzován na HPLC. Pomocí HPLC byl změřen obsah baicalinu, baicaleinu a neutrální červeně.

Sediment vakuol byl resuspendován ve 2 ml methanolu, protřepán a po rozpadu vakuol a uvolnění flavonoidů a NČ do roztoku analyzován na HPLC.

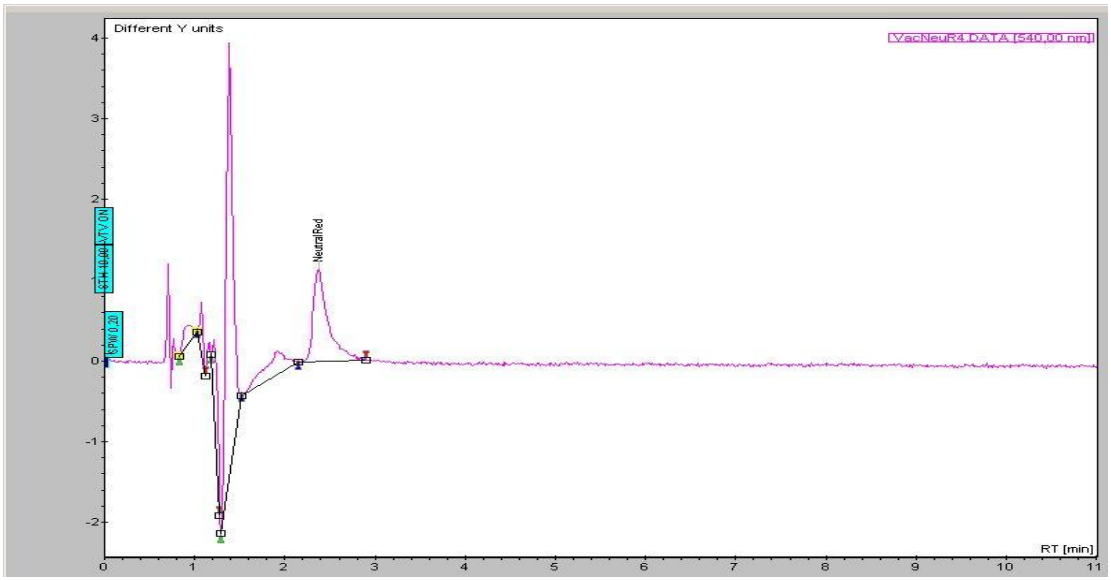
4. 2. 2. HPLC analýza vzorků

analýza neutrální červeně: HPLC analýza byla prováděna na sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055). Sestava byla vybavena předkolonovým filtrem a kolonou Waters µBondpak C 18, 3,9×150 mm s ochrannou předkolonkou. Analýza probíhala isokraticky při konstantním průtoku mobilní fáze 1,4 ml za minutu. Mobilní fáze se skládala z vodného roztoku acetonitrilu (32 %), který obsahoval 0,15 % kyseliny fosforečné (pH=2,9). Detekce byla prováděna pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190-600 nm. Obsah neutrální červeně byl vypočten z píku při vlnové délce 540 nm. Retenční čas byl cca 2 minuty 20 sekund. Obsah neutrální červeně byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí vnějšího standardu téže látky.

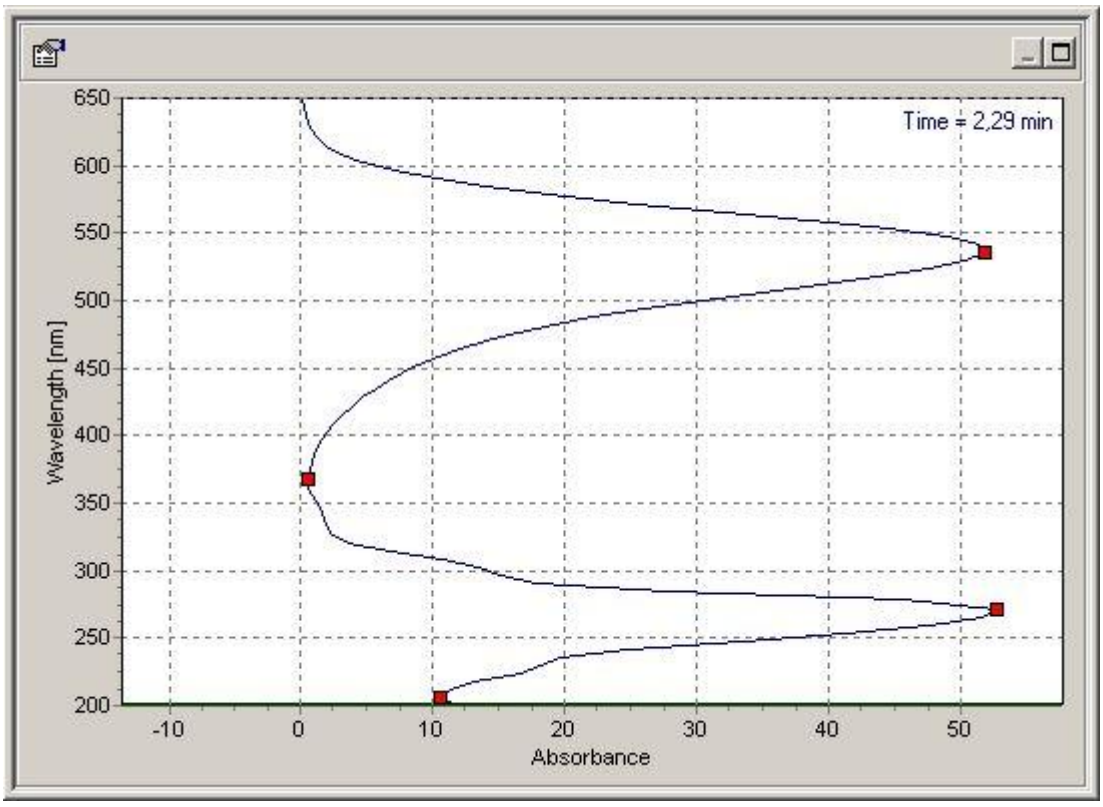
Obrázek č. 3: Chromatogram standardu NČ



Obrázek č. 4: Příklad chromatogramu u vzorku NČ



Obrázek č. 5: Absorpční spektrum NČ



4. 2. 3. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu

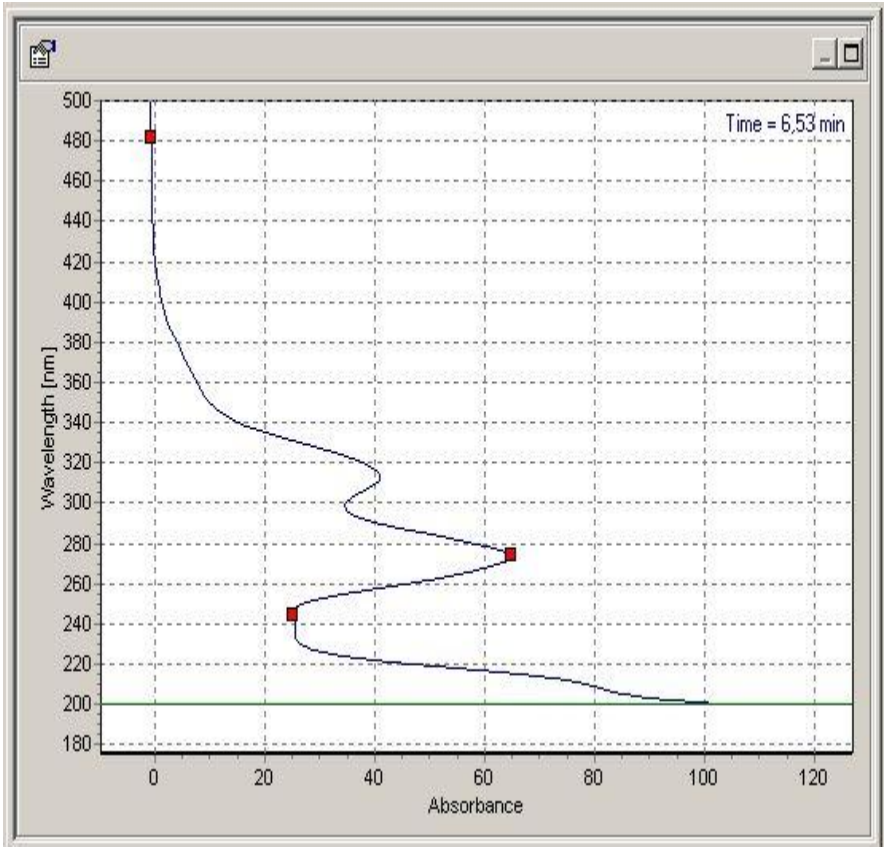
HPLC analýza baicalinu a baicaleinu byla prováděna pouze jako orientační, aby se zjistilo, zda výsledný roztok skutečně obsahoval vakuoly.

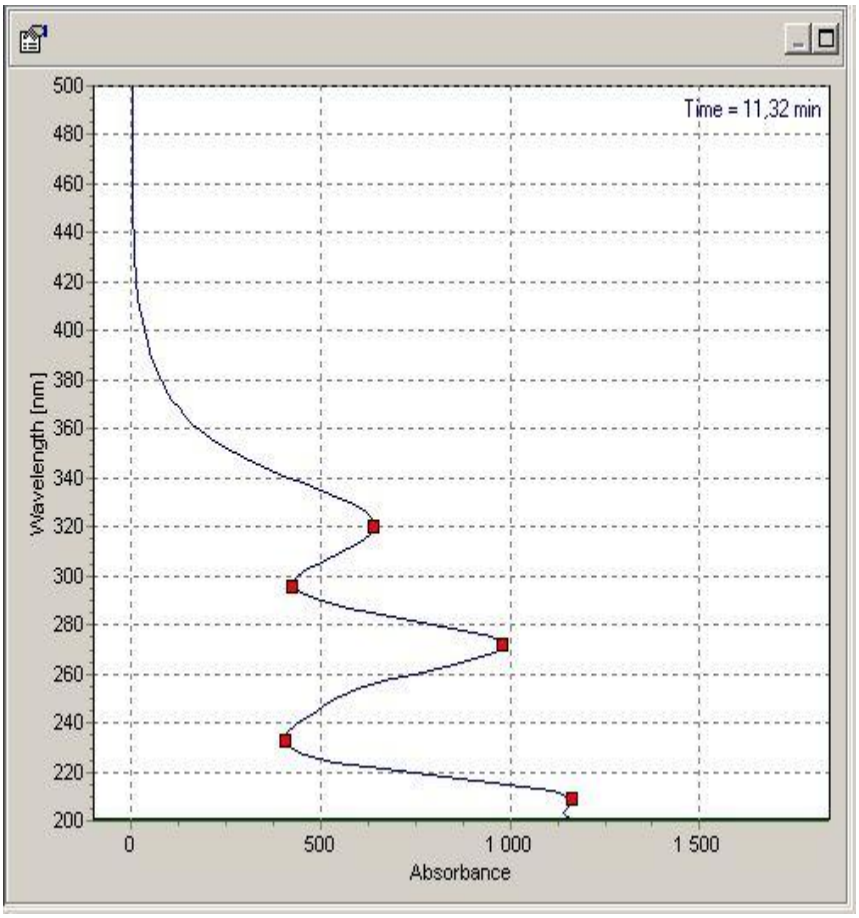
Jednotlivé pasáže suspenzních kultur se výrazně lišily obsahem baicalinu a baicaleinu a i izolovoné vakuoly byly co do obsahu těchto flavonoidů velmi variabilní. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu byla prováděna pouze na vzorcích odebraných při čase t=0 h a fungovala jako kontrola správné izolace vakuol. Supernatant neobsahoval baicalein. V limitním množství kolem 0,01 mg/100 ml obsahoval supernatant baicalin. Usazené vakuoly naopak obsahovaly velké množství baicaleinu a to v rozmezí od 0,5 do 1,5 mg/100 ml a zhruba 0,1 mg/100 ml baicalinu.

Analýza baicalinu a baicaleinu: nastřikovaný objem byl 20 µl. Složení mobilní fáze probíhalo v lineárním gradientu z 50 % methanolu s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné (pH=2,9) v čase t=0 na 75 % methanol s 0,15 % kyselinou fosforečnou v čase t=15 minut při konstantním průtoku mobilní fáze 1,2 ml za minutu.

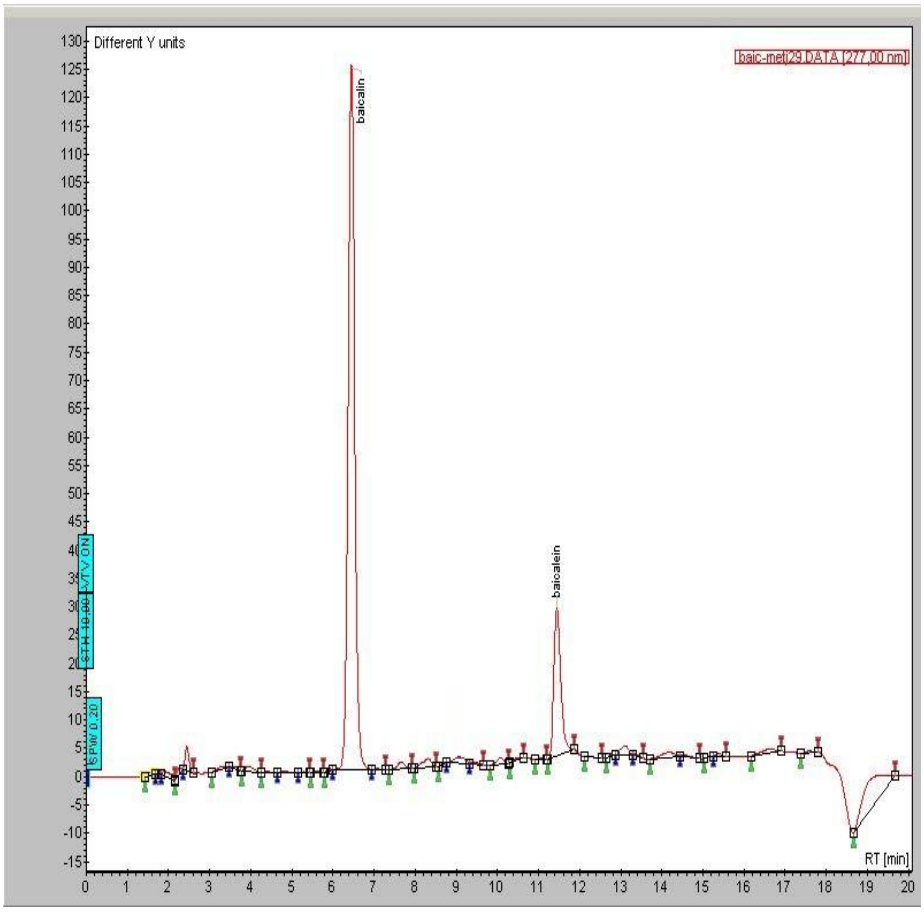
Detekce byla prováděna pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190-450 nm. Obsah sledovaných flavonoidů byl vypočten z píků při vlnové délce 277 nm, ve které mají oba flavonoidy své absorpční maximum. Retenční čas u baicalinu byl cca 6 minut 33 sekund a u baicaleinu byl cca 11 minut 40 sekund. Obsah obou látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí vnějšího standardu téže látky.

Obrázek č. 6: Absorpční spektrum baicalinu (nahoře) a baicaleinu (dole). Je zvýrazněna vlnová délka 277 nm, při které bylo prováděno měření.

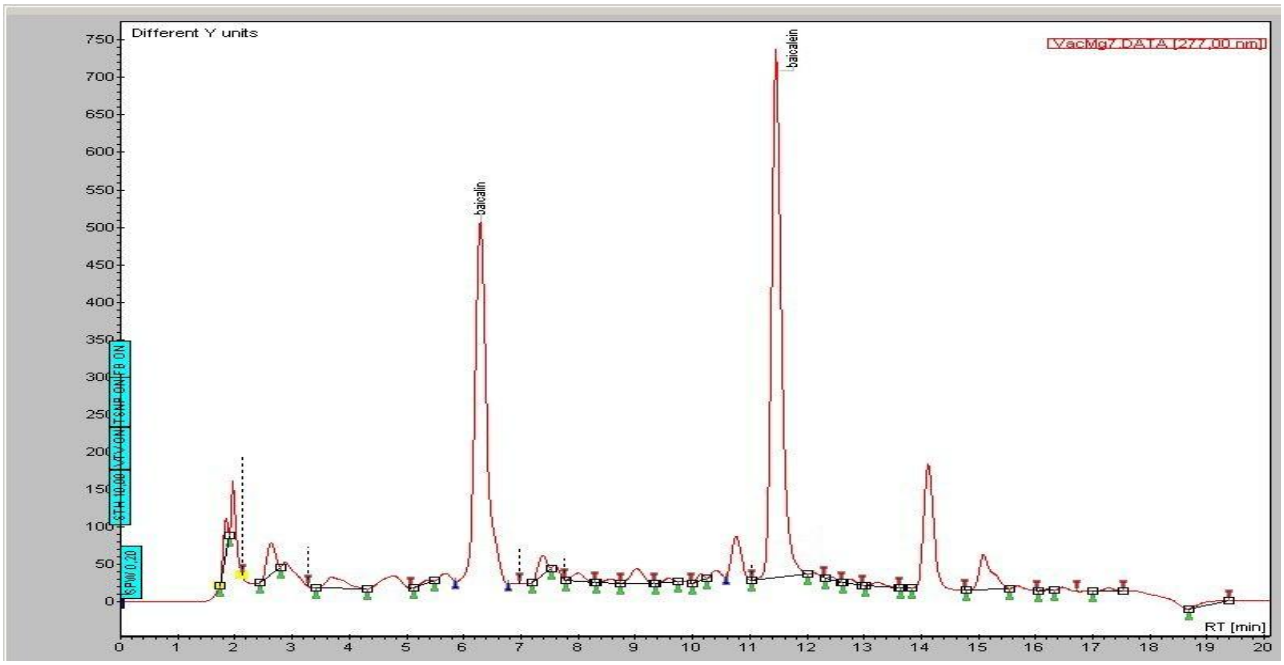




Obrázek č. 7: Ukázka chromatogramu standardů baicalinu a baicaleinu.



Obrázek č. 8: Ukázka chromatogramu vzorku připraveného z izolovaných vakuol *S. baicalensis*



4. 2. 4. Validace HPLC analýzy

Validace znamená ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody).

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco, Unicam) a to normou ISO 9001 (International Organization for Standardization).

Způsobilost chromatografických systémů byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku – tzv. test na přesnost (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearity (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r, která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 3. vydání.[55] Asymetrie píku a počet teoretických pater.

Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry:

Správnost metody - jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem,

porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem).

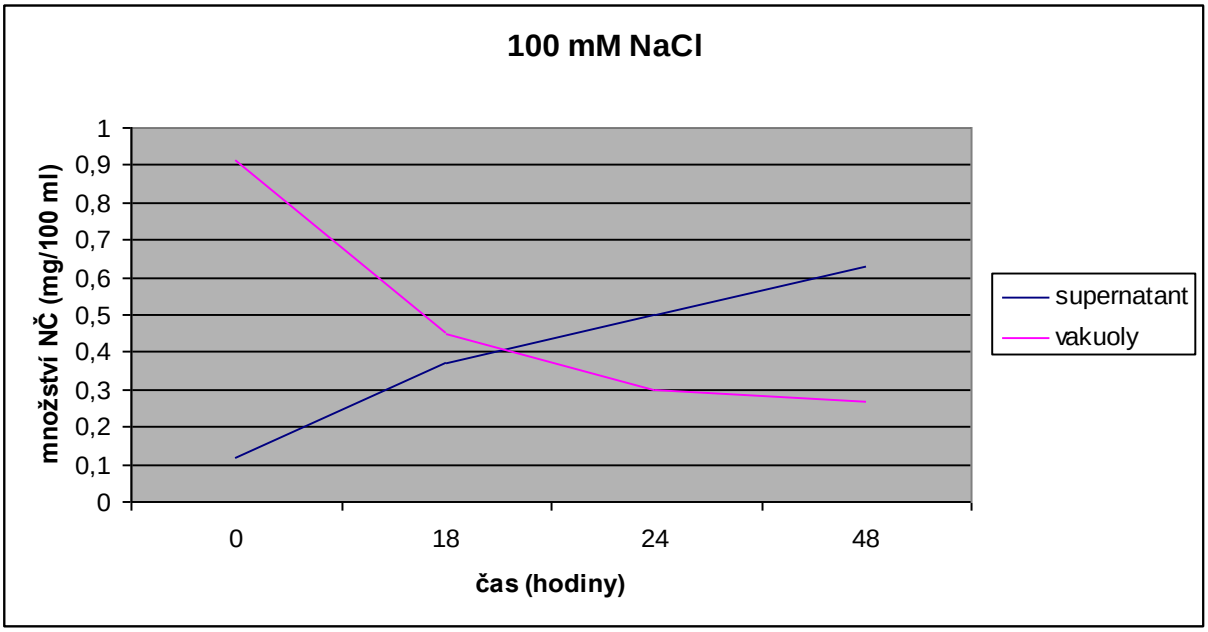
Kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %)[56,57,58]

5. VÝSLEDKY

Tabulka č. 2: Roztok 100 mM NaCl

1OOmM NaCl				
	0 h	**18 h**	**24 h**	**48 h**
supernatant	**0,12 mg/100 ml**	**0,37 mg/100 ml**	**0,5 mg/100 ml**	**0,63 mg/100 ml**
vakuoly	**0,91 mg/100 ml**	**0,45 mg/100 ml**	**0,3 mg/100 ml**	**0,27 mg/100 ml**

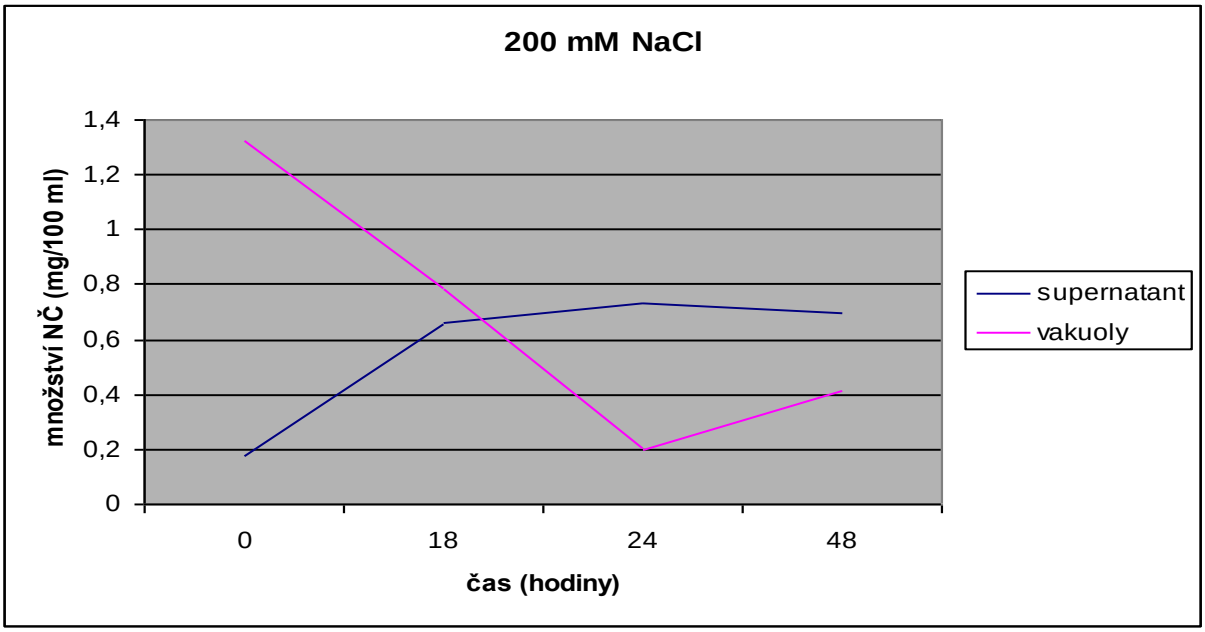
Graf č. 1: Závislost množství NČ na čase ve 100 mM NaCl



Tabulka č. 3: Roztok 200 mM NaCl

2OOmM NaCl				
	0 h	**18 h**	**24 h**	**48 h**
supernatant	**0,18 mg/100 ml**	**0,66 mg/100 ml**	**0,73 mg/100 ml**	**0,7 mg/100 ml**
vakuoly	**1,32 mg/100 ml**	**0,78 mg/100 ml**	**0,2 mg/100 ml**	**0,41 mg/100 ml**

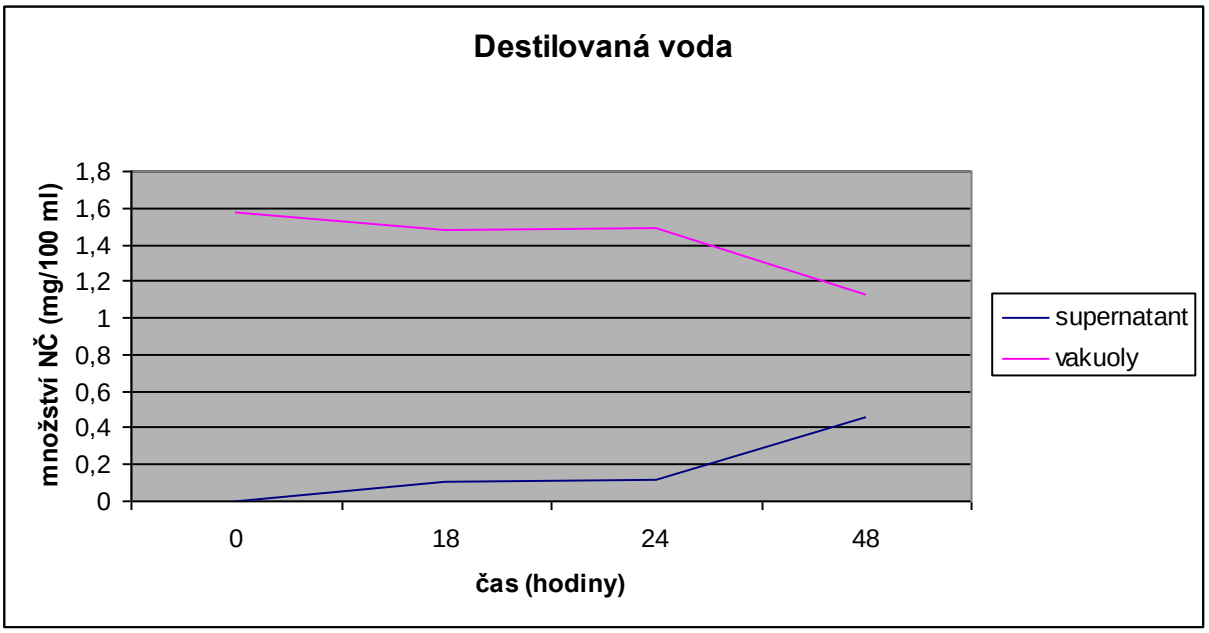
Graf č. 2: Závislost množství NČ na čase ve 200 mM NaCl



Tabulka č. 4: Destilovaná voda

Destilovaná voda				
	0 h	**18 h**	**24 h**	**48 h**
supernatant	**0 mg/100 ml**	**0,11 mg/100 ml**	**0,12 mg/100 ml**	**0,46 mg/100 ml**
vakuoly	**1,58 mg/100 ml**	**1,48 mg/100 ml**	**1,49 mg/100 ml**	**1,13 mg/100 ml**

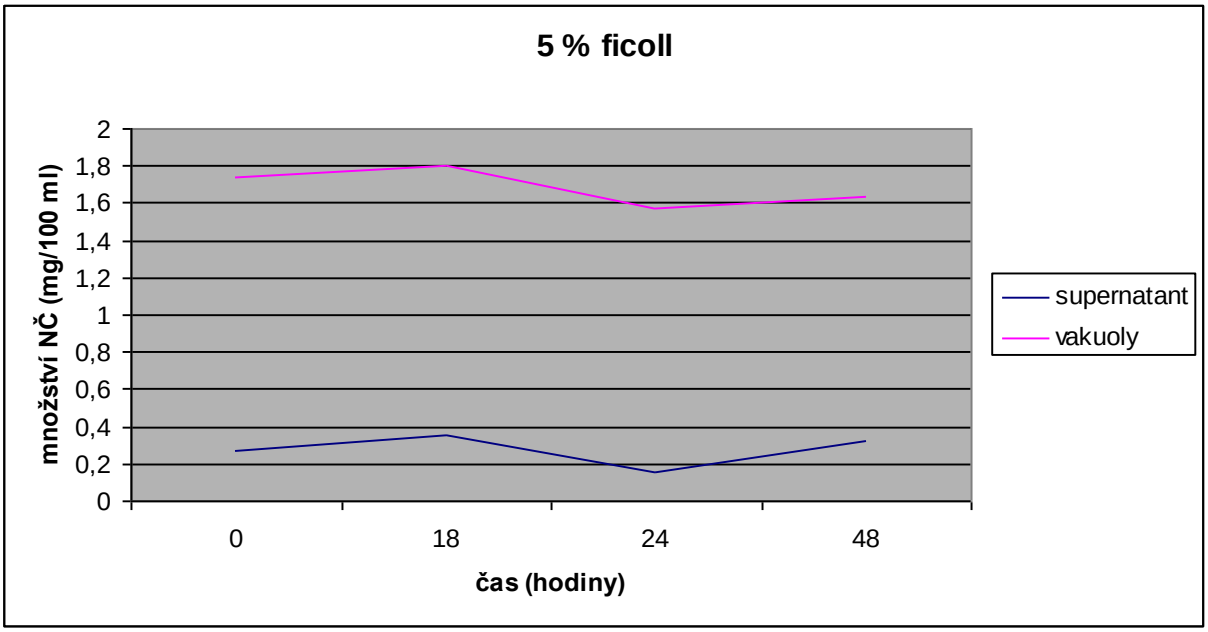
Graf č. 3: Závislost množství NČ na čase v destilované vodě



Tabulka č. 5: Roztok 5 % ficollu 400

5 % ficoll				
	0 h	**18 h**	**24 h**	**48 h**
supernatant	**0,27 mg/100 ml**	**0,35 mg/100 ml**	**0,16 mg/100 ml**	**0,32 mg/100 ml**
vakuoly	**1,74 mg/100 ml**	**1,8 mg/100 ml**	**1,57 mg/100 ml**	**1,64 mg/100 ml**

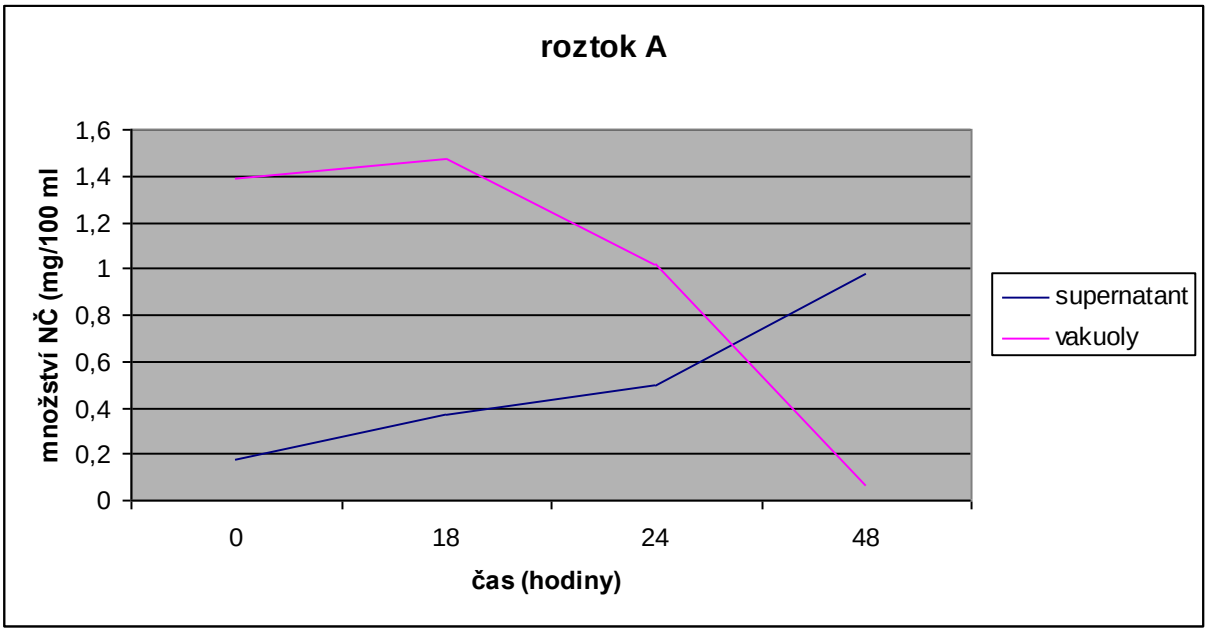
Graf č. 4: Závislost množství NČ na čase v 5 % ficollu 400



Tabulka č. 6: Roztok A

roztok A				
	0 h	**18 h**	**24 h**	**48 h**
supernatant	**0,18 mg/100 ml**	**0,37 mg/100 ml**	**0,5 mg/100 ml**	**0,98 mg/100 ml**
vakuoly	**1,39 mg/100 ml**	**1,47 mg/100 ml**	**1,02 mg/100 ml**	**0,06 mg/100 ml**

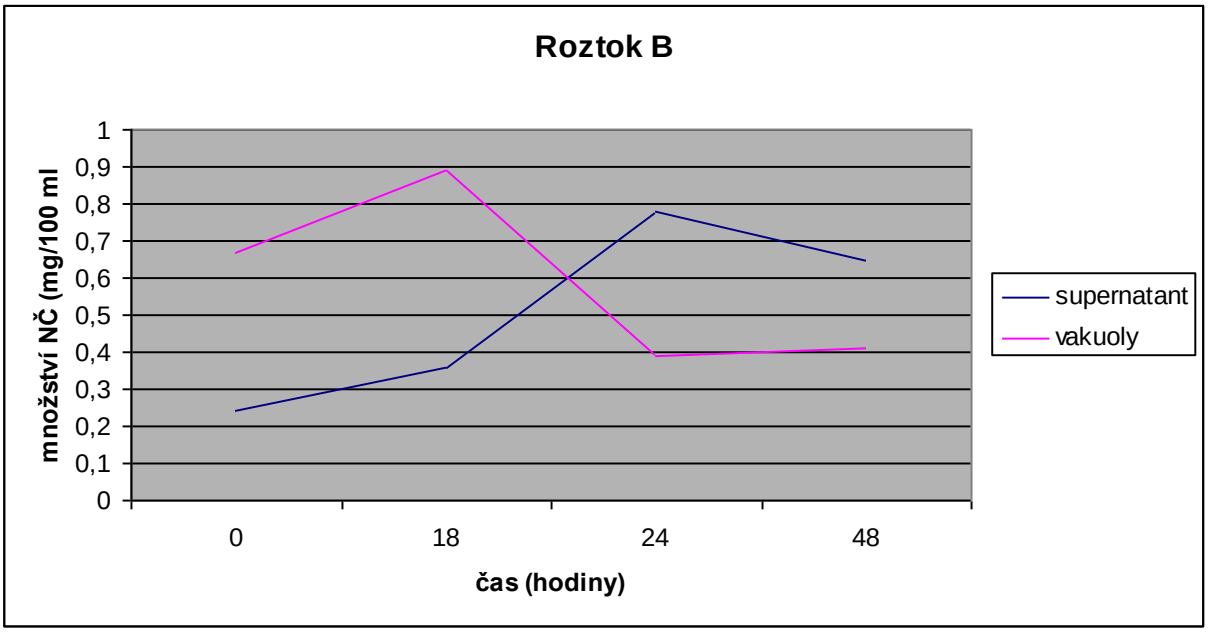
Graf č. 5: Závislost množství NČ na čase v roztoku A



Tabuka č. 7: Roztok B

roztok B				
	0 h	**18 h**	**24 h**	**48 h**
Supernatant	**0,24 mg/100 ml**	**0,36 mg/100 ml**	**0,78 mg/100 ml**	**0,65 mg/100 ml**
Vakuoly	**0,67 mg/100 ml**	**0,89 mg/100 ml**	**0,39 mg/100 ml**	**0,41 mg/100 ml**

Graf č. 6: Závislost množství NČ na čase v roztoku B



6. DISKUSE

Výchozím materiálem pro moje experimenty byl roztok vakuol izolovaných podle postupu Šárky Ševčíkové.[59] Vakuoly se nacházely na povrchu vrstvy 5 % ficollu 400 v malém množství, ale poměrně čisté a mezi vrstvou 5 a 10 % ficollu 400 ve velkém množství ale s nečistotami. Z toho vyplynula nutnost čištění těchto vakuol před dalším experimentem.

Výsledný postup čištění vakuol byl výsledkem vlastních experimentů, při kterých byla měněna koncentrace i množství ficollových roztoků.

Vakuoly byly přečištěny pomocí nového ficollového gradientu: 15 ml 10 % ficollu 400 bylo převrstveno roztokem vakuol a ten byl převrstven 5 ml 2 % ficollu 400. Dále byla provedena centrifugace při 2200 ot./min. Centrifugace trvala 15 minut, poté se vakuoly nacházely v supernatantu (přesněji řečeno nad vrstvou 10 % ficollu 400). Následně bylo odebráno vše kromě usazeniny a dolní vrstvy 10 % ficollu 400. Odebraný roztok byl centrifugován po dobu 15 minut při 4000 ot./min., vakuoly se usazovaly na dně. Sediment obsahoval čisté vakuoly bez přítomnosti jiných organel.

Vakuoly izolované z šišáku byly velmi malé, v buňkách chyběla velká centrální vakuola. Nepatrná velikost izolovaných vakuol ztěžovala jejich mikroskopické pozorování, a proto se v průběhu izolace využilo bervení pomocí neutrální čeveni. Kontrolní pozorování pod mikroskopem nebylo jednoduché i z toho důvodu, že po překrytí krycím sklíčkem byla pozorovaná vrstva příliš silná a nedařilo se zaostřovat na všechny vakuoly zároveň. Bez neustálého proostřování vzorku byla viditelná vždy jen mamá část přítomných vakuol.

Dalším problémem, který komplikoval počítání vakuol při mikroskopickém pozorování, byl pohyb vakuol v roztoku mezi podložním a krycím sklíčkem. Díky obtížnosti počítání vakuol byla zvolena metoda HPLC analýzy neutrální červeni.

Jelikož molekuly neutrální červeně nemají elektrický náboj, přeměňují se v prostředí nízkého pH uvnitř vakuol do iontového stavu. V tomto stavu nemohou pronikat tonoplastem a zůstavají tedy uskladněny ve vakuole.

Měření relativního množství vakuol pomocí HPLC analýzy neutrální červeni spočívalo na předpokladu, že nepoškozené vakuoly obsahovaly NČ a jsou

centrifugovatelné, zatímco poškozené vakuoly uvolňují NČ do roztoku a toto barvivo zůstává po centrifugaci rozpuštěné v supernatantu.

Při počátečních experimentech bylo množství NČ stanovováno spektrofotometricky. Velmi nízké koncentrace NČ ve spojení s malou citlivostí spektrofotometru vedly k nepřesným výsledkům s velkou směrodatnou odchylkou. Proto bylo toto stanovení nahrazeno HPLC analýzou NČ.

Díky časové náročnosti vlastní izolace a čištění vakuol nelze přímo navázat experimenty s vakuolami v tentýž den. Proto je nutné tyto vakuoly uchovávat jeden i více dní. Cílem této práce bylo mimo jiné i najít vhodné médium pro jejich uchovávání. Stabilita vakuol byla zkoušena v různých roztocích. Pro uchovávání vakuol byly testovány tyto roztoky: 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, destilovaná voda, 5 % ficoll 400, roztok A a roztok B (složení viz kapitola 4. 6. 1.). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s roztokem 5 % ficollu 400. V něm se vakuoly nerozpadaly ani druhý den (neuvolňovaly neutrální červeň do roztoku), zůstaly stabilní i po 48 hodinách při 4ºC od izolace.

Překvapivě poměrně stabilní byly vakuoly i v destilované vodě, což je velmi hypotonický roztok, takže by se dalo předpokládat, že se v něm vakuoly brzo zlyzují. Úbytek neutrální červeně ve vakuolách byl patrný teprve po 48 hodinách, naopak vzrostlo množství NČ rozpuštěné v roztoku (tzn. v supernatantu).

5 % ficoll 400 umožňuje tedy uchovávat vakuoly bez problémů do druhého dne.

V dalších experimentech, které by případně navazovaly na tuto práci, by mohly být testovány další roztoky a delší časové úseky. Například ověřit schopnost roztoku 5 % ficollu 400 uchovávat vakuoly i 72 a více hodin.

7. ZÁVĚR

V průběhu této diplomové práce byla zvládnuta kultivace suspenzních kultur *S. baicalensis* a izolace vakuol z těchto kultur. Vlastním cílem této práce bylo vyvinout metodiku pro přečištění vakuolární suspenze od nečistot a určit nejvhodnější roztok pro uchovávání izolovaných vakuol.

Jako nejvhodnější médium pro uchovávání vakuol se ukázal být roztok o složení: 500 mM manitol; 10 mM hepes o pH= 7, 4; 5 % ficoll 400, ve kterém lze uchovávat vakuoly i 48 h aniž by docházelo k jejich výraznějšímu úbytku.

Výsledky této práce tedy umožní další experimenty s čistými vakuolami šišáku bajkalského.

8. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

Obrázek č. 9: Šišák bajkalský (*Scutellaria baicalensis G.)*

Obrázek č. 10: Šišák bajkalský - detail

Obrázek č. 11: HPLC chromatograf JASCO

9. LITERATURA

1. Opletal L., Volák J.: Rostliny pro zdraví, Aventinum, s.6.
2. Korbelář, Endris: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981, s.11.
3. Korbelář, Endris: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981, s.16.
4. Kincl M., doc.ing. Krpeš V.: Základy fyziologie rostlin, Ostravská univerzita, Přírodovědecká fakulta,katedra biologie a ekologie, 2006.
5. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001, s.80.
6. Baloun J., Beneš K., Minařík J.: Farmaceutická botanika, Avicenum, Praha 1978, s. 35-37.
7. Ody, P.: Velký atlas léčivých rostlin, Osveta, Martin 1998, s. 14-17 ; In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 8.
8. internet: http://www.jitrnizeme.cz/view.phpcisloclanku=2005061301; In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 8.
9. Zhang Y. Y. et al.: Biomed. Chromatogr. 12, 31 (1998); In: Deščíkvá V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 8.
10. Duke J. A.: Dr. Duke`s Phytochemical and Ethnobotanical Databases, internet: http://www.arsgrin.gov/cgin/duke/farmacy2.pl?915; In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 8.
11. Jahodář L.: Farmakobotanika-semenné rostliny, Karolinum, Praha 2006, s. 149.
12. Dušek J. et al.: Praktická cvičení z farmakognosie, Karolinum, Praha 2002, s. 22.

13. Brunetan J.: Pharmacognosy, Téchnique and Decumentation, Paris 1999, s. 652.
14. Kazautaka N. et al.: Phytochemistry 52, 885 (1999).
15. Miyaichi Y., Temimori T.: Nat. Med. 52, 82 (1998).
16. Ody, P.: Velký atlas léčivých rostlin, Osveta, Martin 1998, s. 14-17, 98; In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s.9.
17. DiPaola R. S. et al.: New England J. Med. 339, 785 (1998); In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 9.
18. Moyad M. A., Pienta K.J., Montie J. E.: Adult Urol. 54, 319 (1999).
19. Okuda H.: Furi Rajikaru No 10, 13 (1996); In: Chem. Abstr. 127, 314, 297 (1997).
20. Sekiya K., Okuda H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 1090 (1982); In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 9-10.
21. Parmentier J. H. et al.: Hypertension 37, 623 (2001).
22. Kisch E. S. et al.: Hypertension 29, 796 (1997).
23. Takizava H., DelliPizzi A., Nasjletti A.: Hypertension 31, 866 (1998).
24. Wen Y. et al.: Circulation Res. 88, 70 (2001).
25. Martin J., Dušek J.: Praktické lékárenství 1, 27 (2005).
26. Chang Y. L. et al.: Mol. Pharmacol. 60, 507 (2001).
27. Wakabayashi J.: Pharm. Toxicol. 84, 288 (1999).
28. Kim B. R. et al.: Neuroscience Lett. 309, 67 (2001).
29. Hamada H., Hiramatsu M., Maria.: Arch. Biochem. Phys. 306, 261 (1993); In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 10-11.
30. Hara H. et al.: Eur. J. Pharmacol. 221, 193 (1992); In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 11.

31. Sato T. et al.: Chem. Pharm. Bull. 40, 721 (1992); In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 11.
32. Lee M. J. et al.: Nutr. Cancer 34, 185 (1999).
33. Konoshima T. et al.: Chem. Pharm. Bull. 40, 531 (1992); In: Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 12.
34. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001, s. 75-80.
35. Battey N. H. et al.: Plant Cell 11: 643, 659 (1999); In: Francis Marty: The Plant Cell vol.11, 587, 599 (1999).
36. Sanderfoot A. A., Raikhel N. V.: Plant Cell 11: 629, 641 (1999); In: Francis Marty: The Plant Cell vol.11, 587, 599 (1999).
37. Denecke J. et al.: Plant Cell 3, 1025, 1035 (1991); In: Francis Marty: The Plant Cell vol.11, 587, 599 (1999).
38. Francis Marty: The Plant Cell vol. 11, 587, 599 (1999).
39. Stanley N., Jones R. L., Rogers J. C.: Cell 85: 563, 572 (1996); In: Bethke P. C., Jones R. L.: Curr. Opin. Cell Biol. 3, 469 (2000).
40. Bethke P. C., Jones R. L.: Curr. Opin. Cell Biol. 3, 469 (2000).
41. internet: http://www.cs.wikipedia.org./wiki/tonoplast 1.5.2008.
42. Deščíková V.: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2007, s. 22.
43. Klein M. et al.: Phytochemistry 56, 153 (2001).
44. Theodoulon F. L.: Biochem. Biofyz. Acta 1465, 79 (2000).
45. Leigh R. A., Branton D.: Plant Physiol. 58, 656, 662 (1976).
46. Kringstad R., Kenyon W. H., Black C. C. Jr.: Plant Physiol. 66, 379, 382 (1980).
47. Klein M., Martinoia E.: Phytochemistry 56, 153, 159 (2001).
48. Renaudin J. P. et al.: Physiol Plant 68: 695, 703 (1986); In: Contin A., Heijden R., Verpoorte R.: Plant Science 147: 177, 183 (1999).
49. Blom T. J. M.: Transport and accumulation of alcaloids in plant cells, Ph D Thesis, Leiden 1991; In: Contin A., Heijden R., Verpoorte R.: Physiol Plant Science 147: 177, 183 (1999).

50. Vaughn L. E., Davis R. H.: Molecular and Cellular Biology 797, 806 (1981).
51. Thebud R., Santarius K. A.: Plant Physiology 70, 200 (1982); In: Mauro M. A., Queiroz T. D., Cecilia M., F.: Journal of Food Engineering 56: 1, 15 (2002).
52. Carpita N. et al.: Science 205, 1144 (1979); In: Mauro M. A., Queiroz T. D., Cecilia M., F.: Journal of Food Engineering 56: 1, 15 (2002).
53. Mauro M. A., Queiroz T. D., Cecilia M., F.: Journal of Food Engineering 56: 1, 15 (2002).
54. internet: http://www.wikipedia.org/wiki/Neutralred 19. 4. 2008.
55. Kolektiv autorů: European Pharmacopoeia 4th Edition, EDQM, Strasburg 2002.
56. Kolektiv autorů: ČSN ISO 3534-1, Statistika – slovník a značky, část 1.: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny, ČNI, Praha 1994, s. 4.
57. Kolektiv autorů: Věstník SÚKL 1, 6 (1994).
58. Kolektiv autorů: Fed. Reg. 62 (96) – 19 May 1997, 27463 (1997).
59. Šárka Ševčíková: Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2008, s. 38.

ABSTRAKT

Cecílie Šmolíková, Stabilita vakuol izolovaných ze suspenzních *kultur Scutellaria baicalensis Georgii*, diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, vedoucí diplomové práce: Pharm. Dr. Jan Martin Ph.D., Hradec Králové, 2008, 49 stran

Cílem práce bylo vyvinout metodiku pro purifikaci vakuol ze suspenzních kultur šišáku bajkalského a stanovení jejich stability v různých roztocích. Tato práce navazuje na diplomovou práci Šárky Ševčíkové.[59]

Ke své práci jsem použila její výsledný roztok vakuol, z kterého jsem odstranila ostatní organely, zbytky po lýze buněčných stěn a plazmatické membrány. Pro uchovávání vyčištěných vakuol se ukázal být nejlepší roztok o složení : 500 mM manitol; 10 mM hepes o pH= 7, 4; 5 % ficoll 400.

Klíčová slova: purifikace vakuol, *Scutellaria baicalensis*, neutrální červeň, baicalin, baicalein, ficoll 400, tonoplast

ABSTRACT

Cecílie Šmolíková, Stability of vacuoles isolated from *Scutellaria baicalensis Georgii* suspension cultures, diploma work, Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové, trainer of diploma work: Pharm. Dr. Jan Martin Ph.D., Hradec Králové, 2008, 49 pages

The ambition of my work was to develop the methodology for purification of vacuoles from *Scutellaria baicalensis Georgii* suspension cultures and determination of their stability in different solutions. My work is a continuation of the diploma work of Šárka Ševčíková.[59]
For my work I used her final solution of vacuoles from which I removed other organelles, the remains after lysis of cellular walls and the plasmatic membranes. The best solution for storage of the purified vacuoles proved to be the solution made up from: 500 mM manitol; 10 mM hepes pH= 7, 4; 5 % ficoll 400.

Key words: purification of vacuoles, *Scutellaria baicalensis*, neutral red, baicalin, baicalein, ficoll 400, tonoplast