

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOSIE

Kamila Táboříková

Ovlivnění metabolismu a transportu flavonoidů
v kulturách *in vitro* I.

(Diplomová práce)

Datum zadání: 30. 11. 2007

Datum odevzdání: 15. 5. 2009

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.

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

Oponent: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

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 farmakognosie za ochotu pomoci a přístrojové zabezpečení experimentální části diplomové práce.

Kamila Táboříková

Obsah

1	Úvod	6
2	Cíl práce.....	7
3	Teoretická část	8
3.1	Popis rostliny	8
3.2	Droga a její využití	8
3.3	Obsahové látky	10
3.4	Biologické účinky	11
3.4.1	Antioxidační účinek a vychytávání volných radikálů	11
3.4.2	Protizánětlivý účinek.....	11
3.4.3	Antibakteriální, antivirová a antimykotická aktivita.....	12
3.4.4	Působení proti vzniku trombózy.....	12
3.4.5	Cytostatická a imunomodulační aktivita	12
3.4.6	Sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní účinky.....	13
3.4.7	Jiné účinky.....	13
3.5	Biosyntéza flavonoidů	13
3.6	Explantátové kultury.....	16
3.6.1	Definice a význam explantátových kultur.....	16
3.6.2	Vlastní kultivace.....	19
3.6.3	Nejpoužívanější metody pro ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách	19
3.7	Rostlinné vakuoly.....	21
3.7.1	Definice vakuol	21
3.7.2	Různorodost vakuol	21
3.7.3	Funkce vakuol	22
3.7.4	Endomembránové markery	23
3.8	Buněčné transportéry (transport látek přes membrány).....	23
3.8.1	Transport látek přes vakuolární membránu	24

4	Experimentální část.....	31
4.1	Použité chemikálie a přístroje	31
4.1.1	Chemikálie	31
4.1.2	Přístroje	31
4.2	Kultivace a pasážování suspenzních kultur <i>S. baicalensis</i>	31
4.2.1	Kultivace	31
4.2.2	Pasážování	33
4.3	Izolace vakuol šišáku bajkalského	33
4.3.1	Izolace protoplastů	33
4.3.2	Izolace vakuol	33
4.4	Sledování transportu mezi vakuolou a vnějším prostředím.....	36
4.4.1	Příprava roztoků potřebných pro pokusy	36
4.4.2	Odběr vzorků	36
4.4.3	Vlastní pokusy.....	36
4.5	HPLC analýza baicaleinu a baicalinu	37
4.5.1	HPLC analýza.....	37
4.5.2	Validace HPLC analýzy	39
4.6	Statistické zpracování výsledků	40
5	Výsledky	42
5.1	Vliv kyseliny glukuronové na obsah flavonoidů	42
5.2	Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicaleinu na obsah flavonoidů	44
5.3	Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicalinu na obsah flavonoidů	46
5.4	Vliv kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP na obsah flavonoidů.....	48
6	Diskuze	50
7	Závěr.....	53
8	Abstrakt.....	54
9	Abstract	55
10	Citovaná literatura	56

1 Úvod

V rámci rostlinné říše (kolem 1 milionu druhů) a v okruhu cévnatých rostlin (kolem 500 tisíc druhů) představují léčivé rostliny velmi významnou skupinu. S rozvojem výzkumu přírodních látek počet druhů řazených mezi léčivé rostliny neustále roste. (1)

V první polovině 19. století léčba pomocí rostlin pod vlivem rozvoje chemických syntéz znatelně poklesla, v druhé polovině 20. století však jako reakce na negativní vliv nadměrného užívání syntetických léků nastává v terapii onemocnění nejrůznějšího původu „renesance“ léčivých rostlin. Spotřeba rostlinných preparátů dnes neustále roste. Lidé spoléhají na rostliny jako na tradiční léčiva. (2)

Rostliny představují významný zdroj sacharidů, tuků, bílkovin, aminokyselin a vitamínů. Kromě těchto složek nepostradatelných pro jejich růst, produkují i celou řadu jiných látek. Tyto látky, které jsou pravděpodobně pro vlastní růst rostliny postradatelné, se nazývají sekundární metabolity. Zastávají regulační funkce metabolismu, nebo mohou hrát roli například hmyzích atraktantů. Pro člověka pak tyto látky mohou mít význam jako léčiva, chuťové a vonné přísady, barviva apod.

Syntéza komplexní struktury sekundárních metabolitů a jiných obsahových látek bývá často komplikovaná. Chemické syntézy mohou být nejen obtížné a u složitějších látek neuskutečnitelné, ale také drahé a neefektivní. Biologické zdroje tak představují vhodnou alternativu pro získávání těchto látek. Kromě klasické zemědělské produkce jsou středem zájmu i jiné způsoby využití biosyntetického potenciálu rostlinných druhů. Tkáňové kultury *in vitro* představují jeden z těchto alternativních přístupů, který poskytuje výhody plně kontrolovatelných podmínek v nezávislosti na geografických a klimatických podmínkách. Průmyslové využití tkáňových kultur jako nového zdroje sekundárních metabolitů je podmíněné tím, aby jejich produkce tímto způsobem byla ekonomičtější než tradiční postupy získávání těchto látek. (3)

2 Cíl práce

Tato diplomová práce se zabývá kultivací explantátových kultur šišáku bajkalského, izolací vakuol z těchto kultur a ovlivněním transportu flavonoidů přes vakuolární membránu *in vitro*.

Cílem práce bylo:

1. Zvládnout techniky spojené s kultivací *in vitro* kultur
2. Osvojit si metodiku izolace vakuol ze suspenzních kultur *Scutellaria baicalensis*
3. Zvládnout HPLC analýzu obsahových látek šišáku bajkalského
4. Sledovat vliv vybraných potenciálních aktivátorů a inhibitorů transportních mechanismů na transport flavonoidů přes tonoplast

3 Teoretická část

3.1 Popis rostliny

Rod *Scutellaria* (šišák) zahrnuje asi 300 druhů, které jsou s výjimkou tropické Afriky rozšířené po celém světě. Rostliny se vyskytují ve formě bylin, polokeřů i keřů, jsou jedno- i víceleté.

Významnou léčivou bylinou je především *Scutellaria baicalensis* Georgii, šišák bajkalský. Je to vytrvalá bylina z čeledi *Lamiaceae* dosahující výšky 30 až 60 cm. Roste planě v lesostepních oblastech na sušších, kamenitých svazích, především ve východním Zabajkalí, na středním toku Amuru, v severní Koreji, Číně, Japonsku a severovýchodním Mongolsku. (4, 5)

Jasně zelené kopinaté až vejčitě kopinaté listy jsou křížmostojné. Stonek je vzpřímený až polopoléhavý, bohatě větvený, řídce a krátce chlupatý. Květy vyrůstají ve vrcholových, hroznovitých květenstvích. Koruna je dvoupyská s dlouhou trubkou a je jasně modře zbarvená. Právě proto byly vyšlechtěny i kultivary s okrasnou funkcí.

Plodem jsou tvrdky uzavřené v kalichu. Obsahují drobná černá semena. Bylina má vřetenovitý, masitý kořen, který je na povrchu hnědý a uvnitř žlutý.

I když je tato rostlina domácí ve Východní Asii, i u nás má poměrně vhodné klimatické podmínky a dá se zde dobře pěstovat. Množí se semeny, která se vysévají na konci března. Šišák bajkalský není rostlina náročná na půdu ani na hnojení. Také ošetřování za vegetace nevyžaduje žádné specifické zásahy. (4, 6, 7)

3.2 Droga a její využití

Šišák bajkalský lze v dnešní době nazvat rostlinou třetího tisíciletí. Řadí se k nejvýznamnějším rostlinám tradiční čínské a tibetské medicíny. Ačkoliv jde o rostlinu s širokým terapeutickým využitím, není v Evropě zatím příliš známá.

Drogou je kořen (*Radix scutellariae*), který obsahuje řadu účinných látek. Droga se získává z kořenů tří-, nebo čtyřletých rostlin sbíraných na jaře, nebo na podzim.

Hmotnost dvouletých kořenů se pohybuje okolo 12 g, u tříletých je to asi 23 g. Optimální je sklízet kořeny ze tříletých rostlin.

Po očištění a odstranění zevní hrubé vrstvy a po rozkrojení na menší kousky se kořen ve slabé vrstvě suší v suchých místnostech přírodním nebo umělým teplem.

V praxi se droga nejčastěji používá ve formě extraktu. Ten se připraví tak, že se 100 g jemně tlučených suchých kořenů přelije asi 600 ml 70% ethanolu a uzavře v tmavé lahvi. Obsah se občas protřepe a po 1-2 týdnech zfiltruje. Užívá se 20-30 kapek třikrát denně.

Užití šišáku bajkalského ve fytoterapii je velice široké. Používá se ke snižování krevního tlaku, vykazuje protikřečové a protialergické účinky, snižuje teplotu, působí žlučopudně a močopudně a má protizánětlivé účinky (léčí zejména záněty krků, ledvin a jater).

Šišák se také doporučuje užívat při hysterii a úzkosti. V Evropě se používá při léčbě epilepsie, v Severní Americe zejména na ženské problémy.

Droga je účinná i při vnitřním krvácení a krvácení z nosu. Významné jsou antioxidantní účinky, potvrzena byla také antibakteriální a antivirová aktivita. Významné je i preventivní působení proti vzniku trombóz a rakovinných nádorů. *Radix scutellariae* se uplatňuje také v pediatrii u dětí, které trpí nočním pomočováním a nočním děsem. Droga působí diuretický a detoxikačně na organismus. Podporuje odbourávání škodlivého LDL cholesterolu.

V tradiční tibetské medicíně se odvar z kořenů používá při řadě infekčních nemocí, revmatismu, myokarditidách a arytmií.

Z hlediska tradiční čínské medicíny šišák bajkalský (*huangqin*) pročišťuje horko a vylučuje patogenní oheň a jedy. Zastavuje krvácení a působí preventivně proti potratu. Další indikací je kašel se žlutými hleny způsobený horkem plic a krvácením. Bylina se rovněž aplikuje na vředy a karbunkly.

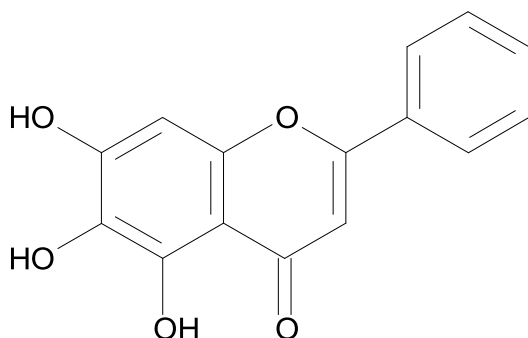
Přestože se některé druhy šišáku nedoporučují užívat při graviditě, tradiční čínská medicína s úspěchem předepisuje *huangqin* těhotným ženám pokud je jejich plod v důsledku horka neklidný. Nesmějí ho ale užívat osoby, které trpí chladem v žaludku a ve slezině, což se projevuje nechutenstvím. (4, 7-9)

3.3 Obsahové látky

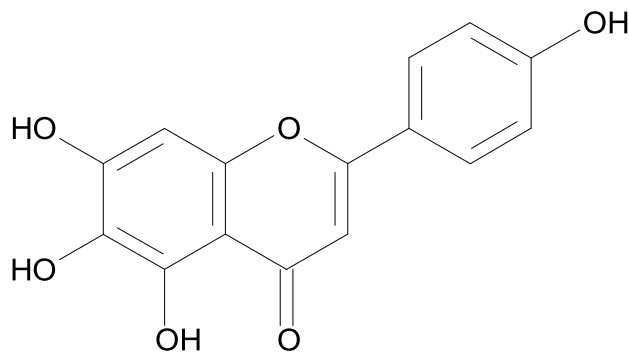
Na rozdíl od většiny příbuzných rostlin z čeledi *Lamiaceae* nejsou hlavní účinnou látkou silice, ale flavonoidy. Celkem jich v této rostlině bylo identifikováno přes 40. Jsou přítomny ve formě glykosidů jako glukuronidy a glukopyranosidy. Dávají kořenové droze žlutou barvu, pro kterou je droga lidově nazývána „zlatý kořen“.

I když obsah jednotlivých flavonoidů kolísá s ročním obdobím i s lokalitou sběru, rostliny nejvíce obsahují flavonoid baicalin. Obsah této látky kolísá od 4 % do 17 % v závislosti na době a lokalitě sběru. V rostlině je ve větším množství přítomen i jeho aglykon baicalein. Dalšími významnými glykosidy jsou i wogonosid a scutellarin a jejich aglykony wogonin a scutellarein, oroxylin A, scullcapflavon I a scullcapflavon II, neobaicalein. Dále se zde nacházejí iridoidy a sesquilignanové glykosidy.

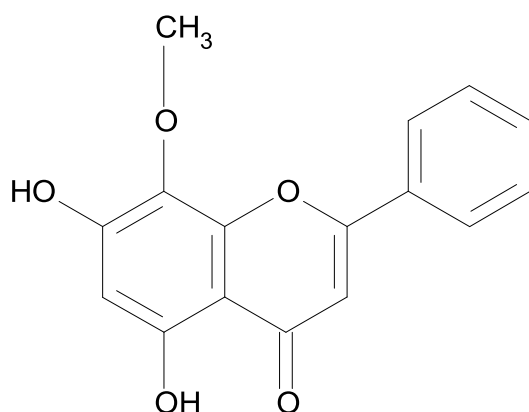
Kromě flavonoidů se v rostlině nacházejí i steroidní saponiny, 2-5 % tříslovin a pryskyřic, rostlinné steroly (betasitosterol, kampesterol), organické kyseliny (kyselina benzoová), melanin (0,75 µg na 1g drogy) a minerální látky. (4, 6-9)



Obr. 1 Struktura baicaleinu



Obr. 2 Struktura scutellareinu



Obr. 3 Struktura wogoninu

3.4 Biologické účinky

V současné době jsou prozkoumány nejenom účinky drogy, ale i samotného baicalinu a baicaleinu. Mají výrazný antioxidační účinek, působí proti řadě mikroorganismů, působí také cytostaticky a imunomodulačně, mají mírný sedativní a antikonvulzivní účinek. Z některých studií je patrný i vliv na fibrinolytický systém a na vazokonstrikci a vasodilataci. Jedním z nejdůležitějších a nejověřenějších je však účinek protizánětlivý. (6)

3.4.1 Antioxidační účinek a vylučování volných radikálů

Vylučování volných radikálů je neocenitelnou vlastností drogy. Působením volných radikálů totiž dochází k přímému poškození bílkovin, nukleových kyselin a lipidů, což vede k narušení buněčných membrán a organel. (9)

Antioxidační schopnost mají zejména flavonoidy baicalin a baicalein. Tyto vlastnosti jsou značné a několikanásobně předčí i známé antioxidačně působící vitamíny A, C a E. (8)

Mechanismus vylučování volných radikálů podporuje protizánětlivý účinek drogy. Během zánětlivého procesu jsou ve zvýšené míře produkovány volné radikály, které jsou zneškodňovány zejména baicalinem a baicaleinem. Díky schopnosti vylučovat volné radikály a zabraňovat tak oxidaci je šišák bajkalský v poslední době používán také v kosmetických přípravcích. (6)

3.4.2 Protizánětlivý účinek

Protizánětlivý účinek šišáku bajkalského je založen na inhibici lipoxygenázy a cyklooxygenázy, což jsou enzymy, které hrají významnou roli v metabolismu kyseliny arachidonové. Oba enzymy pomáhají přeměnit volnou kyselinu arachidonovou na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany, které také hrají důležitou roli v mechanismu

zánětlivého procesu. Za inhibici lipoxygenázy je zodpovědný baicalein, cyklooxygenáza -2 je navíc inhibována i wogoninem.

Ačkoliv všechny mechanismy účastníci se protizánětlivého procesu nejsou ještě prozkoumány, je jasné, že *Scutellariae radix* je jedním z nejúčinnějších přírodních antiflogistik. (6)

3.4.3 Antibakteriální, antivirová a antimykotická aktivita.

V dnešní době, kdy začínají být bakterie vůči některým antibiotikům odolné, nabývají antiseptické vlastnosti šišáku bajkalského na významu. Výzkum ve Velké Británii ukázal, že pokud je tato bylina podávána současně s antibiotiky, účinkuje třeba i na bakterie, které by jinak byly vůči lékům méně citlivé. V Japonsku bylo zase prokázáno antivirové působení šišáku na chřipku – dělení chřipkového viru se po přidání výtažku ze šišáku bajkalského snížilo o 50-90 %. Laboratorně byly potvrzeny i účinky proti viru HIV. Kromě antibakteriální a antivirové aktivity byl prokázán i účinek proti plísním. Šišák působí zejména proti kvasinkám *Candida albicans*. (6, 7)

3.4.4 Působení proti vzniku trombóz

Dalším účinkem, který byl u šišáku prokázán, je preventivní působení proti vzniku trombóz. Flavonoidy a další látky obsažené v šišáku bajkalském brání usazování LDL cholesterolu v cévách, flavonoidy navíc cévy napomáhají zpevňovat a také podporují vstřebávání vitamínu C. (8)

3.4.5 Cytostatická a imunomodulační aktivita

Nejnovějším poznatkem je schopnost obsahových látek šišáku bajkalského působit preventivně proti vzniku rakovinných nádorů a zabraňovat růstu nádorům již vzniklých. Tato aktivita souvisí se schopností vychytávat volné radikály. Ty přímo poškozují bílkoviny nukleové kyseliny, lipidy i samotnou DNA. Opakované nadměrné poškozování nukleových kyselin může vést ke vzniku rakovinných nádorů.

Extrakt ze šišáku bajkalského vykazuje také imunomodulační aktivitu. Pomáhá normalizovat počet T obranných lymfocytů u pacientů s rakovinou plic, kteří prošli chemoterapií. Současně zvyšuje počet imunoglobulinu A, podporuje tvorbu krve především v produkci erytrocytů a granulocytů v kostní dřeni a zvyšuje množství prekurzorů (erytrozy, granulomonocytární prekurzory). Látky ze šišáku tak napomáhají obnovovat imunitní systém po velkém zatížení, jakým je např. chemoterapie. Baicalein je pro svoji malou

toxicitu a velkou účinnost perspektivní přírodní látkou pro prevenci a léčbu v raných stadiích tohoto typu rakoviny. (8)

3.4.6 Sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní účinky

Flavonoidy obsahují fenylobenzopyronové jádro, které se velmi podobá struktuře benzodiazepinů. Díky této podobnosti se flavonoidy mohou vázat na benzodiazepinové vazebné místo na GABA_A receptorech. Nejpevněji je vázán wogonin, který je tak zřejmě zodpovědný za mírné sedativní účinky drogy. K tomuto účinku se ještě připojuje výrazný anxiolytický efekt.

U vodného roztoku kořene šišáku byla také prokázána antikonvulzivní aktivita. Tento efekt však není způsoben schopností vazby na GABA_A receptory, ale spíše zabráněním šíření křečového záchvatu. (9)

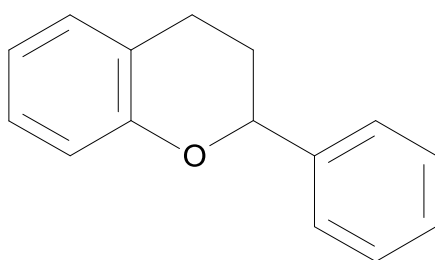
3.4.7 Jiné účinky

Mezi další účinky drogy patří:

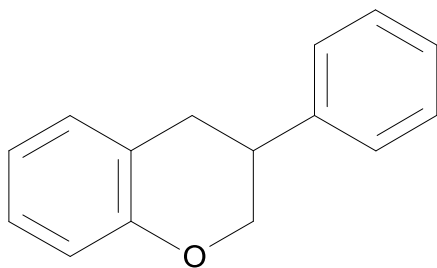
- Vazokonstrikce (v malých koncentracích) a vazodilatace (ve vyšších koncentracích)
- Antialergické účinky
- Inhibice enzymu *alfa*-glukosidázy, xantinoxidázy
- a další účinky (9)

3.5 Biosyntéza flavonoidů

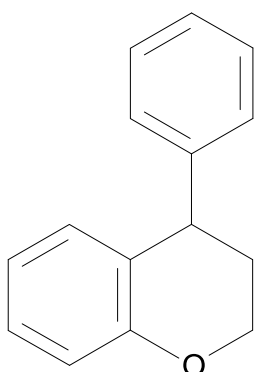
Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany).



Obr. 4 Struktura flavanu



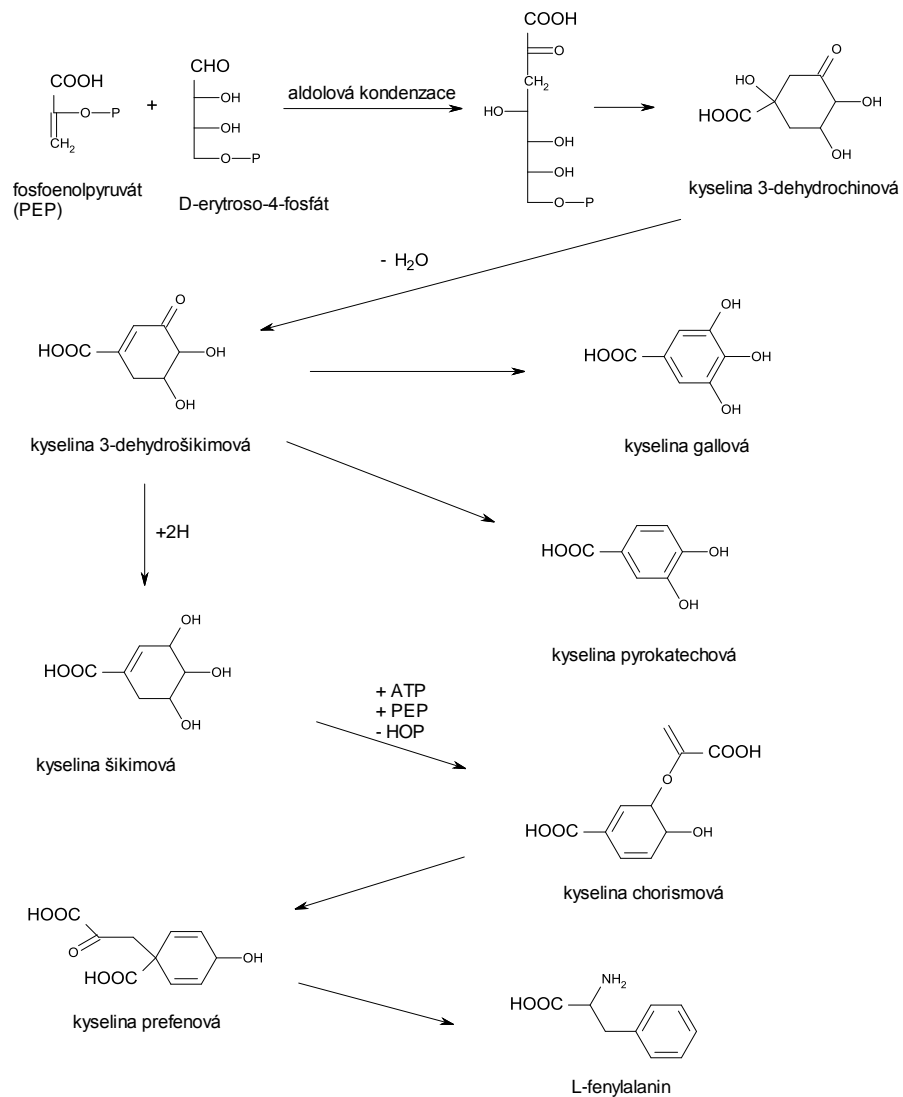
Obr. 5 Struktura izoflavanu



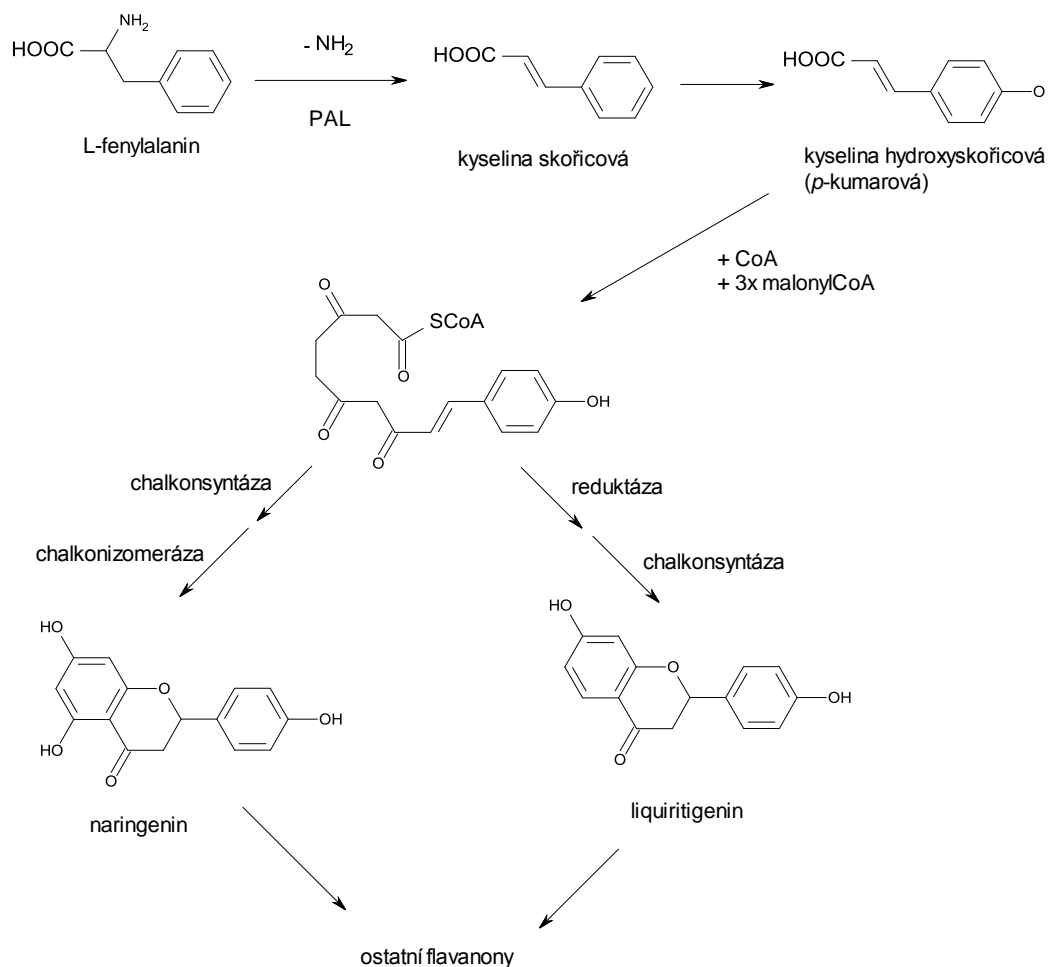
Obr. 6 Struktura neoflavanu

V rostlinné říši, konkrétně v cévnatých rostlinách, se nejčastěji vyskytují flavany, řidčeji isoflavany, vzácně neoflavany.

Aglykony flavonoidních glykosidů jsou produkty vznikající oběma hlavními cestami vedoucími k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Jeden 6 -uhlíkový fragment se odvozuje z acetátového metabolismu a zbývající 9-uhlíková část z kyseliny šikimové. Tato šikimátová cesta probíhá jen u mikroorganismů a rostlin a jejími produkty jsou esenciální aminokyseliny, které živočichové přijímají pouze potravou. Biosyntéza začíná aldolovou kondenzací fosfoenolpyruvátu (PEP) s D-erytrozo- 4- fosfátem. Následující reakce vedou k syntéze kyseliny šikimové. Poté nastává fosforylace této kyseliny a přes řadu meziproductů (kyseliny chorismová, kyselina prefenová, L-fenylalanin, kyselina skořicová, kyselina *p*-kumarová) vzniká cyklopeptidická sloučenina, která se podle podmínek prostředí přemění enzymem chalkonsyntázou buď na naringenin, nebo liquiritigenin, což jsou sloučeniny určující strukturu flavonoidů. (10)



Obr. 7 Biosyntéza flavonoidů - první část



Obr. 8 Biosyntéza flavonoidů - druhá část

Takto vzniklé flavonoidní struktury jsou obvykle spojeny s molekulou cukru a vytváří glykozidy. Cukernou složku tvoří nejčastěji glukóza, rhamnóza, nebo kyselina glukuronová. V rostlinných buňkách se obvykle vyskytuje jak glykozidní forma, tak příslušný volný glykozid. Glykozidní forma ovšem většinou převažuje.

3.6 Explantátové kultury

3.6.1 Definice a význam explantátových kultur

Explantátové kultury rostlin (resp. kultury rostlinných explantátů) jsou izolované rostlinné orgány, pletiva, nebo buňky pěstované *in vitro* za sterlních specifických podmínek na zvláštních živných půdách. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterlního prostředí a kultivovat za definovaných podmínek. (3, 11)

V rostlinném organismu je totipotentní nejenom zygota a meristematická buňka, ale i kterákoliv jiná buňka. Změnou podmínek, ve kterých se specializovaná rostlinná buňka

nachází, je možné v mnohých případech vyvolat dediferenciace a neorganizovaný růst. Každá buňka uchovává genetickou informaci a proto je schopná vytvářet řadu chemických sloučenin, které se nachází v mateřské rostlině. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury. (3, 11)

Úspěch kultivace je v mnoha případech závislý nejen na vystižení nejvhodnějšího kultivačního média, ale i na velikosti explantátu, jeho fyziologickém stavu a potenciálních schopnostech daného druhu (jednoděložné rostliny mají ve srovnání s dvouděložnými nižší schopnost tvorby kalusu, mnohem pomaleji rostou i kalusy dřevin). (3, 12)

Je důležité znát regenerační schopnosti množené rostliny a samozřejmě zachování sterilních podmínek. V příznivých podmínkách pokračuje explantát v růstu a regeneruje v celou rostlinu, nebo vytváří kalus a na jeho povrchu dochází k embryogenezi. Lze se samozřejmě pokusit o namnožení i bez splnění všech zmíněných podmínek, nebo je možné se pokusit u neznámé rostliny složení živné půdy odhadnout. Podmínku sterility je však nutné dodržet vždy. Bez zachování sterilních podmínek hrozí reálné riziko selhání pokusu. (13)

Produkce sekundárních metabolitů je dále ovlivněna stářím kultury, stupněm diference buněk a obdobím kultivační periody. (12)

Výhody této technologie, oproti běžné zemědělské produkci, jsou následující:

- Je nezávislá na geografických a environmentálních podmínkách, výsledné produkty jsou po kvalitativní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně polních kultur.
- Je možné vytvořit nové látky, které se nevyskytují v mateřské rostlině, z níž je kultura odvozena
- Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách
- Účinné obnovování
- Rychlost produkce
- Uchovávání genobanky jednotlivých druhů, kultivarů
- Ozdravování rostlin a produkce bezvirózního materiálu

Rostlinné buňky mohou vytvořit stereo- a regiospecifické biotransformace pro produkci nových sloučenin. (9, 14)

V posledních desetiletích se explantátové kultury staly nepostradatelnou součástí celé řady biologických oborů zabývajících se studiem rostlin. (3)

Rozlišuje se několik druhů explantátových kultur:

1. Kalus – skládá se z beztvaré masy volně uspořádaných tenkostěnných parenchymatických buněk. Tyto kultury jsou velmi důležité v rostlinné biotechnologii, mohou být také využity k založení buněčných suspenzí.
2. Buněčné suspenzní kultury – představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Použití tekutých médií umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živým médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou rychle přístupné. Snadný přístup živin a dobrá výměna dýchacích plynů umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze. Tyto kultury se hojně využívají jako modelový systém při studiu procesů sekundárního metabolismu.
3. Kultury protoplastů – protoplasty jsou rostlinné buňky s odstraněnou buněčnou stěnou. Technika tkáňových kultur umožňuje kultivovat i takovéto buňky. Nepřítomnost buněčné stěny a zachování metabolické a funkční kapacity umožňuje studium transportu látek přes cytoplazmatickou membránu, studium biosyntéz spojených s regenerací buněčné stěny a dovoluje izolaci organel. Na protoplastových kulturách je možné sledovat proces obnovy buněčné stěny, vnášet do buněk větší částice – organely, molekuly nukleových kyselin a bílkovin.
4. Kořenové kultury – mohou být vytvořeny z kořenové špičky, z primárních nebo laterálních kořenů. Růst kořenů *in vitro* je potenciálně neomezený, protože kořeny jsou nedeterminované orgány. Po infekci agrobakteriem *rhizogenes* dochází k vytvoření vlasatých kořenů („hairy roots“). Vlasaté kořeny mohou být kultivovány *in vitro* a využity v rostlinné biotechnologii k produkci sekundárních metabolitů nebo farmaceutických proteinů.
5. Prýtové meristémové kultury – vrcholky prýtlů mohou být kultivovány *in vitro*. Tato metoda může být použita pro vegetativní rozmnožování.
6. Embryová kultura – embrya mohou být použita jako explantáty k vytvoření kalusových kultur.
7. Prašňíkové kultury – představují kultivaci izolovaných prašňíků. Mikrospory jsou v průběhu jejich kultivace v kontaktu se somatickými buňkami pletiva prašňíku.

8. Mikrosporová kultura – vedle prašnickových kultur se používají kultury izolovaných mikrospor. Tato technika byla zatím úspěšně zvládnuta jen u malého počtu druhů (např. *Datura*, *Nicotiana* a *Brassica*). (15)

3.6.2 Vlastní kultivace

Důležitým krokem před vlastní kultivací je výběr vhodné matečné rostliny s vysokou produkcí metabolitu, který je od kultury požadován. Část některého orgánu sterilní rostliny se umístí *in vitro* na vhodné sterilní agarové médium.

Po několika týdnech se objeví primární kalus schopný rozmnožování na novém médiu. Pokud je dodržena podmínka pravidelného pasážování, je kalus po odstranění zbytku výchozího orgánu schopen ve vhodném médiu neomezeně proliferovat. Po větším počtu pasáží se získá stabilní a homogenní rostlinný materiál, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace. (12)

Rostlinné kultury jsou atraktivním zdrojem vysoce ceněných sekundárních metabolitů. To je také hlavní důvod založení explantátové kultury. Cílem kultivace je izolace sekundárních metabolitů za takových podmínek a v takovém množství, aby celkový výnos kultury byl větší, než u volně rostoucích rostlin. Z tohoto důvodu je žádoucí neustálé zdokonalování biotechnologických postupů. (9, 12)

3.6.3 Nejpoužívanější metody pro ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách

3.6.3.1 Ovlivnění kultivačních podmínek

Základní podmínkou pěstování explantátových kultur je použití vhodného živného média. Pro jednotlivé druhy se často složení média liší, ale bylo vypracováno několik základních druhů živných médií, např. médium podle Murashigeho a Skooha (tzv. MS medium), médium podle Gamborga (B5), médium podle Schenka a Hildebranta (SH), vhodných pro většinu explantátových kultur. (12)

Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny (nebo další zdroj organického dusíku), sacharidy, růstové regulátory a případně látky upravující fyzikální vlastnosti média. (3)

K základním fyzikálním faktorům působícím na rostlinné explantáty patří intenzita světla, teplota, pH živného media, sterilita kultivačního prostředí. V závislosti na intenzitě

světla dochází často v intaktních rostlinách i tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů. Světlo může být stimulujičím faktorem, ale existují i skupiny látek, jejichž produkci světlo inhibuje. Záleží i na části rostliny, ze které byla kultura odvozena. Teplota kultivace se většinou pohybuje mezi 17 až 25°C, optimální hodnota pH živného media je obvykle mezi 4,5 až 6,0, i když v závislosti na typu kultury může být i jiná.

Sterilita prostředí rostlinného materiálu a živného média je důležitá pro prevenci kontaminace kultury plísněmi a bakteriemi, kterým médium může vytvářet příznivé podmínky pro růst. (12)

3.6.3.2 Přidání prekurzoru do živného média

Jednou z možností stimulace tvorby sekundárních metabolitů je přidání prekurzoru do živného media. Tato metoda je výhodná pouze v případě, že prekurzor je mnohem levnější než produkt a má určité požadované vlastnosti, hlavně schopnost dostat se z média do organely, ve které probíhá příslušná metabolická přeměna. (9)

3.6.3.3 Biotransformace

Biotransformace může být realizována kulturou, v níž je celá biosyntetická sekvence určité látky porušena, ale enzym schopný zprostředkovat danou reakci je tvořen v dostatečném množství. K rostlinnému materiálu je přidán exogenní substrát, který je rostlinnou buňkou nebo orgánem přijat, zapojen do metabolického procesu a vlivem rostlinných enzymů přeměněn na výsledný produkt. Tato biosyntetická cesta se jeví výhodná pro stereo- a regiospecifické reakce, u kterých je běžné chemické provedení finančně náročné. (12)

3.6.3.4 Elicitace

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Proces elicitace využívá schopnosti rostlin i rostlinných buněk reagovat na různé stresové podněty řadou obranných reakcí, které vedou ke zvýšené produkci a akumulaci sekundárních metabolitů. Počátkem všech obranných reakcí je signál pro jejich spuštění – elicitor. Elicitory dělíme na abiotické a biotické. Mezi abiotické řadíme fyzikální faktory – změna pH, teploty, osmotického tlaku, UV záření a chemické faktory (těžké kovy a jejich soli, atb, pesticidy). Biotickými elicitory jsou viry, bakterie, houby, kvasinky, mykoplazmata a organické molekuly pocházející z těchto organismů (např. oligomery chitinu z hub). (9, 12)

3.6.3.5 Imobilizace

Imobilizace buněk na povrchu polymerové matrice, popřípadě přímo v ní, vede často ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů. Imobilizace se děje ukotvením rostlinných buněk na povrchu nosiče (nosič může mít podobu částic, sítě nebo stěny), zachycením uvnitř gelových částic, nebo např. obalením buněk membránovou vrstvou. (9)

3.6.3.6 Manipulace s genetickým materiálem

Genetické manipulace spočívají v izolaci genetického materiálu, jeho následné úpravě a transferu zpět do organismu nebo do buněčných struktur. V případě zvýšení produkce sekundárních metabolitů u rostlin jsou používány dvě základní metody. První z těchto metod mění expresi jednoho nebo několika genů kódujících klíčové kroky biosyntézy. Druhá metoda je zaměřena na exprese regulatorních genů, které kontrolují příslušné biosyntetické cesty. (12)

3.7 Rostlinné vakuoly

3.7.1 Definice vakuol

Vakuoly jsou drobné či větší útvary ohraničené polopropustnou membránou. Od cytoplazmy jsou odděleny membránou – tonoplastem, která neustále kontroluje transport látek do vakuoly a zpět. Vakuola je vyplněná vakuolární tekutinou (nazývanou také buněčná šťáva). Tuto buněčnou šťávu tvoří vodný roztok mnoha organických a anorganických substancí. U velké části zralých rostlinných buněk je vakuola nejobjemnější organelou a může tvořit 80 % i více objemu celé buňky.

3.7.2 Různorodost vakuol

Vakuoly rostlinných buněk jsou obecně různorodé z hlediska tvaru, obsahu i funkce. Jednotlivé buňky mohou obsahovat jeden, ale i více druhů vakuol. Ani jednotlivé části rostlinné vakuoly nejsou ve všech buňkách stejné. Záleží na typu buňky, taxonomickém zařazení rostliny a také na jejím stáří a fyziologickém stavu.

V mnoha meristemických buňkách (s výjimkou vaskulárního kambia) je místo jedné velké centrální vakuoly mnoho malých vakuol, někdy nazývaných provakuoly. Počátky těchto provakuol jsou v tzv. vezikulech – váčcích, odvozených z Golgiho aparátu, nebo z endoplazmatického retikula. Tak jak se zvětšují buňky, i provakuoly se spojují, zvětšují a rozrůstají a postupně vytvoří centrální vakuolu. Vzájemné splývání vezikul a provakuol ve větší vakuoly je charakteristické pro většinu rostlinných buněk a probíhá nejintenzivněji v období prodlužovacího růstu buněk. (16)

3.7.3 Funkce vakuol

Vakuola buněk vyšších rostlin je důležitou součástí buněčné fyziologie a to zejména v udržování buněčného metabolismu. Slouží jako dlouhodobá zásobárna toxických iontů, dlouho- i krátkodobá zásobárna minerálů a organických kyselin. Tato organela je důležitá i z důvodu udržování cytoplazmatického pH a Ca^{2+} homeostázy. (17)

Vakuoly představují vnitřní prostředí cytoplazmy. Transportní systém umístěný v tonoplastu hraje důležitou roli ve schopnosti měnit rychlost a směr transportu látek ve vakuole.

Tyto organely také slouží k uskladnění zásobních látek. Jsou zásobárnou látek buněčného metabolismu, jako jsou AMK, organické kyseliny, nitráty, fosfáty a řady dalších látek, které jsou transportovány do cytoplazmy a při aktuální potřebě buňky jsou k dispozici. Ve vakuolách zásobních tkání mohou být některé rezervní látky skladovány delší dobu. Jsou to zejména rozpustné monosacharidy (hlavně glukóza a fruktóza), oligo- nebo polysacharidy.

Další funkce rostlinných vakuol spočívá ve skladování sekundárních metabolitů, jako jsou například alkaloidy, flavonoidy, taniny. Řada z těchto látek je ve vyšší koncentraci pro rostlinnou buňku toxická. Transportem do vakuoly je jejich negativní vliv na jiné buněčné pochody odstraněn.

Ve vakuolách se často ukládají pigmenty. Nejrozšířenější skupinou barevných pigmentů jsou antokyany, které jsou příčinou barevných kombinací rostlin. Ve vakuolách je přítomno mnoho různých druhů antokyanů, které se barevně liší. Obvykle se vyskytují ve směsích a výsledná barva závisí na typu anthokyanů (na jejich chemickém uspořádání, na jejich poměru ve směsi a na celkovém množství). Barevnost také závisí také na pH buněčné šťávy a na přítomnosti chelátů kovových iontů. Ve vakuolách se vyskytuje i mnoho bezbarvých flavonoidů. Některé z nich mají stejnou funkci jako barevné látky (jsou viditelné pro určité druhy hmyzu). Jejich hlavní úloha ale spočívá v ochraně rostliny proti UV záření, které je nebezpečné pro živé buňky.

Vakuoly jsou velmi důležité pro osmoregulaci. Díky přítomnosti vakuol a pevné buněčné stěny mohou rostlinné buňky fungovat jako osmotický systém. Intracelulární tekutina vakuoly obsahuje vysoce koncentrované rozpustné látky (sacharidy, aminokyseliny) a anorganické látky, které přispívají hlavně k intracelulární osmóze. (16)

3.7.4 Endomembránové markery

Jako maker je označován identifikační znak, který je typický pro různé buňky a organely. S jeho pomocí je možné tyto struktury identifikovat. Nedostatek markerů specifických pro vakuoly je hlavní překážkou v porozumění rostlinným organelám. Přesná interpretace mnohých dat vyžaduje dokonalou identifikaci jednotlivých součástí membrány. Pohled na rostlinné vakuoly i na vakuolární kompartmenty je sporný. Je to tím, že neexistuje shoda ve spolehlivých markerech. Markery pro jednotlivé komponenty sice byly navrženy, ovšem nebyla prokázána jejich jednoznačnost. (9)

3.8 Buněčné transportéry (transport látek přes membrány)

K biologickým membránám řadíme plazmatickou membránu (membrána ohraničující buňku) a membrány ohraničující organely (obě mitochondriální membrány, ER, Golgiho aparát, jádro, lysozomy atp., u rostlin též membrány chloroplastů). I když se tyto membrány liší strukturou i funkcí, obecné vlastnosti mají společné.

Nejdůležitější vlastností biologických membrán je selektivita jejich prostupnosti. Díky vlastnostem fosfolipidové dvojvrstvy a v ní přítomných bílkovin umožňuje selektivně a často regulovatelně transport látek po (pasivní transport) i proti (aktivní transport) jejich elektrochemickému gradientu. Na membránové struktury jsou rovněž vázány enzymatické systémy katalyzující některé kroky metabolických drah.

Biologické membrány jsou prostupné pro řadu látek, které by lipidovou dvojvrstvou nedifundovaly nebo by difundovaly velmi pomalu. Je to způsobeno přítomností transmembránových proteinů, které umožní selektivně a regulovatelně difúzi určitým molekulám. Tyto transportní proteiny můžeme rozdělit do dvou velkých skupin:

- a) přenašečové proteiny (permeázy, transportéry, carriers): obvykle přenášejí nízkomolekulární organické látky. Během přenosu dochází k interakci přenašečového proteinu s přenášenou látkou a následné konformační změně, jejímž výsledkem je uvolnění přenášené látky na druhé straně membrány.
- b) kanály: obvykle přenášejí ionty, jde o transmembránové bílkoviny, které ve středu své molekuly mají otvor s hydrofilním prostředím, které selektivně propouští určitý iont. Během průchodu iontu nedochází ke konformační změně proteinu ani významné interakci s přenášeným iontem. Rychlost difúze je tedy větší než u přenašečových proteinů. Podstatou regulovatelnosti tohoto způsobu facilitované difúze je otevírání

a uzavírání kanálů: tedy konformační změna, která činí kanál prostupným nebo neprostupným. Existují kanály napětově řízené (reagují na změnu membránového potenciálu) nebo chemicky řízené (reagují na vazbu určité signální molekuly).

Uvedené mechanismy se týkají pasivních transportních dějů – tedy přenosu látek bez dodání energie, po směru elektrochemického gradientu.

Druhou možností přenosu je aktivní transport, což znamená přenos látky proti elektrochemickému gradientu. Vždy je v tomto ději zainteresován přenašečový protein, který zároveň aktivní transport spřahuje s nějakým exergonním dějem, aby byl termodynamicky vůbec možný. Podle zdroje energie známe 2 způsoby aktivních transportů:

- a) hydrolýza ATP: transportní protein má zároveň ATPasovou aktivitu.
- b) spřažení s transportem jiné látky po koncentračním gradientu: je-li druhá látka transportována ve stejném směru jako látka transportovaná aktivně, jedná se o symport, je-li transportována ve směru opačném, jde o antiport. (18)

3.8.1 Transport látek přes vakuolární membránu

Membrána, která obklopuje obsah vakuoly, se nazývá tonoplast. Strukturálně je v zásadě obdobná jako cytoplazmatická membrána, má však lehce specifické složení. Má odlišné zastoupení jednotlivých druhů lipidů v lipidové dvojvrstvě a obsahuje pro vakuolu (tedy pro tonoplast) specifické bílkoviny. Mnoho biologických procesů zajišťovaných vakuolou začíná interakcí látek z cytoplasmy s povrchem tonoplastu. Tonoplast proto musí být od membrán jiných organel odlišitelný. Odlišné zastoupení bílkovin a lipidů tuto identifikaci umožňuje. Na jejím základě může být protein, nebo obsah transportního váčku, dopraven cíleně do konkrétního typu vakuoly. (19)

Sekundární metabolity, produkované rostlinou jako reakce na různé stresové faktory, mohou být pro buňku potenciálně toxické, a proto se ukládají ve vakuolách. Mechanismy, kterými se různé chemické látky dostanou do vakuoly, jsou již delší dobu předmětem výzkumu.(12)

Předpokládají se tyto mechanismy transportu přes tonoplast:

a) Protonové pumpy

Rostlinné vakuoly jsou jedinečné mezi eukaryotickými organelami mimo jiné tím, že vlastní dvě protonové pumpy – vakuolární H^+ -ATPázu (V-ATPáza) a vakuolární H^+ -pyrofosfatázu (V-PPáza). (9)

Tyto primární aktivní pumpy jsou lokalizovány ve vakuolární membráně rostlinné buňky – tonoplastu. Jedná se o multipodjednotkové enzymy, které se skládají ze dvou odlišných domén: transmembránový protonový kanál (V0) a připojený katalytický komplex (V1). Složení podjednotek enzymu se v závislosti na rostlinném druhu může lišit. Doména V0 připojuje doménu V1 k cytoplazmatickému povrchu membrány a slouží k translokaci protonů do lumen endomembránového kompartmentu. (9, 20)

V-PPáza je jednoduchý polypeptid, který vystupuje jako dimer.

Primární aktivní transportéry představují všude se vyskytující skupiny protonových pump, které můžeme nalézt v mnoha buněčných organelách, jako jsou lysozomy, endozomy, vylučovací a zásobní váčky a také v tonoplastu vyšších rostlin, hub a kvasinek. V-ATPáza jako enzym byla také objevena v membránách speciálních buněk obratlovců (osteoblasty, neutrofilů a epiteliální buňky ledvin a močového měchýře). V-ATPáza v biologické přeměně vytváří hydrolýzou ATP PMF (proton - motive– force) a tak poskytuje řídicí sílu celé řadě sekundárně aktivních i pasivních transportních procesů. Enzym napodobuje F_0F_1 -ATPázy (F-ATPázy) mitochondrií, chloroplastů a eubakterií v jejich struktuře. Jde o enzymy, které syntetizují ATP a energii k tomu poskytuje transport H^+ po koncentračním gradientu. V-ATPáza je charakteristická specifickými inhibitory, např. NO_3^- nebo bafilomycin A1. V-ATPáza přenáší protony z cytoplazmy do lumen vakuoly. K tomu využívá energii z hydrolýzy ATP, čímž vytvoří H^+ elektrochemický gradient, který je hnací silou mnoha transportních dějů. Shromažďování aniontů, např. Cl^- a NO_3^- ve vakuolách, je řízena elektrickým potenciálem přes tonoplast. (17, 21)

Stejně jako V-ATPáza, i V-PPáza katalyzuje přenos H^+ iontů přes tonoplast. Nicméně, na rozdíl od V-ATPázy, V-PPáza získává energii z hydrolýzy PPI a je zřejmě přítomna jenom v rostlinách a fototropních bakteriích.

Bylo prokázáno několik funkcí tohoto enzymu v rostlinných buňkách. Může vystupovat jako ochranný systém do doby ustavení pH gradientu přes tonoplast a je využit k sekundárnímu aktivnímu transportu. Funkce spočívá i v regulaci cytosolického pH. Role

V-PPázy byla prokázána i v přenosu K^+ iontů do vakuoly. Význam toho to enzymu se předpokládá i v regulaci vnitřního tlaku buňky. (21)

b) Spřažený transport

Jedním z nejvýznamnějších transportních systémů je Ca^{2+}/H^+ antiport. Akumulace vakuolárních vápenatých iontů je nyní dobře rozpoznána a vysvětluje se aktivitou právě tohoto antiportu. Pokud je ale tento transport příliš aktivní, vede ke zvýšené akumulaci vápenatých iontů ve vakuole a tím se sníží dostupnost iontů v jiných částech rostliny.

Dalším důležitým transportérem H^+ iontů je Na^+/H^+ antiport. Oba tyto systémy hrají důležitou roli v homeostáze iontů a mají významnou úlohu i v řízení osmotického tlaku. (9, 21)

c) Iontové kanály

Existuje několik typů iontových kanálů. Z pohledu tonoplastu jsou nejdůležitější TIP (proteiny vnitřní strany tonoplastu). Tyto proteiny jsou mnohdy nejvíce zastoupenými vakuolárními transportéry. Řada z nich funguje jako vodní kanály, tzv. akvaporiny. Různé rostlinné druhy se liší TIP geny. Tyto geny jsou proto rozdílně regulovány a různé TIP mohou být využívány za specifických podmínek.

In vivo funkce TIPů zůstávají zatím nejasné. Mnoho z nich transportuje vodu a díky tomu je tonoplast vysoce propustný. Některé TIPy, např. v buňkách tabáku, se podílí na transportu vody i na transportu solutů glycerolu a urey. TIPy se ve spojení se svými protějšky plasmatické membrány mohou účastnit dlouhodobé regulace cytosolických a vakuolárních objemů.

TIPy byly navrženy také jako markery vakuolární funkce. Bylo prokázáno, že různé druhy vakuol obsahují různé druhy TIP (α -TIP, γ – TIP, δ – TIP). Lytické vakuoly měly jen γ – TIP, autofagické vakuoly jen α – TIP a zásobní vakuoly δ -TIP. V budoucnu by TIPy mohly sloužit také jako markery pro vývoj vakuol a jejich změnu. (9)

3.8.1.1 Transportéry sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny produkují obrovské množství sekundárních metabolitů (alkaloidy, terpenoidy, polyfenoly a mnoho dalších sloučenin), které jsou děleny do několika skupin podle způsobu jejich biosyntézy a podle strukturálních rysů. K docílení jejich funkce, jako je ochrana rostliny před UV zářením a patogeny, jsou sekundární metabolity shromažďovány ve specifických tkáních nebo ve speciálních typech buněk, ve kterých je tato akumulace

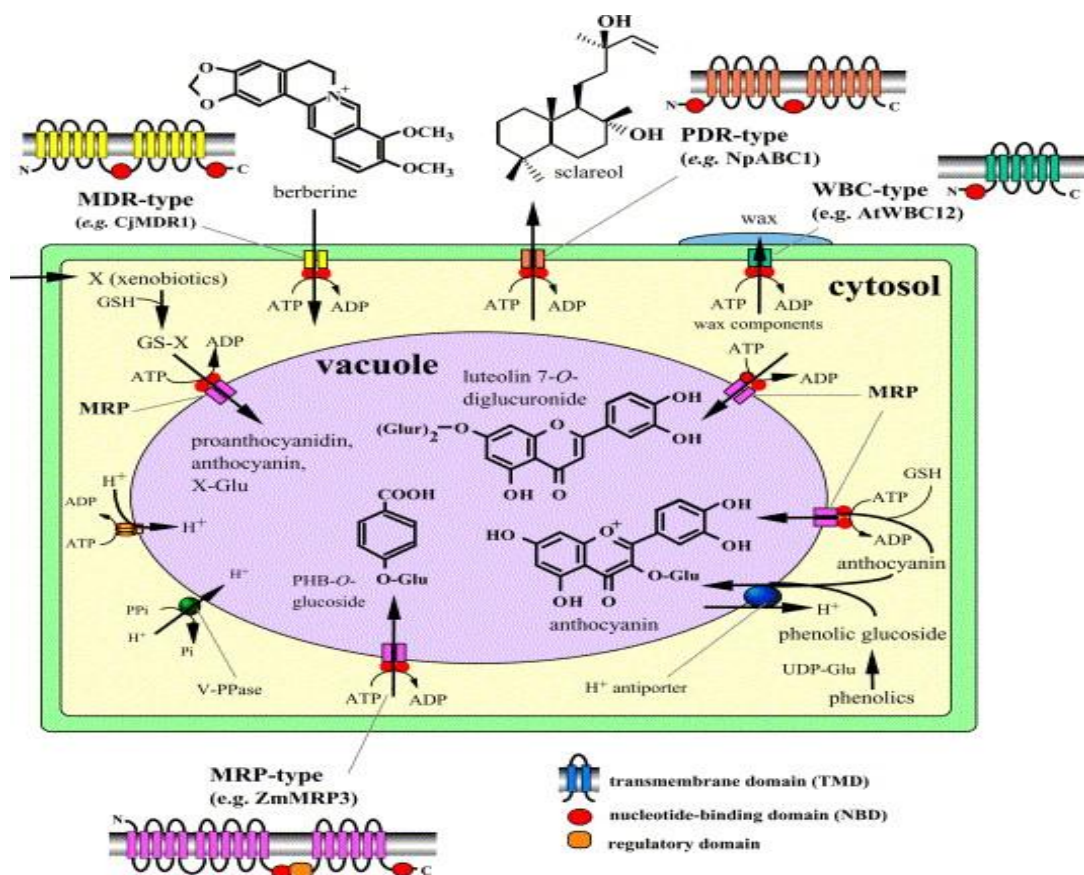
nebo sekrece vysoce regulována. Např. flavonoidy ochraňující buňku před UV zářením jsou shromažďovány v epidermálních buňkách a atraktanty působící proti hmyzu pocházejí z okvětních lístků.

Sekundární metabolity jsou často transportovány z hlavní vakuoly do sousedních buněk, nebo do konce do jiných tkání, či vzdálenějších orgánů.

Zásobní vakuola, která často zaujímá až 90 % vnitřního objemu rostlinné buňky, hraje ústřední roli v akumulaci sekundárních metabolitů v rostlině. Shromažďování sekundárních metabolitů ve vakuole má minimálně dvě pozitivní role: Odlučování biologicky aktivních metabolitů uvnitř buňky a ochrana metabolitů pocházejících z katabolismu.

Existují dva základní mechanismy, kterými se sekundární metabolity dostávají přes vakuolu: H^+ sekundární-dependentní transport přes H^+ antiport a primární transport pomocí ABC transportérů.

Membránový transport sekundárních metabolitů je stále předmětem výzkumu. Nedávné studie genomu odhalily, že mnoho transportérů a kanálů se nachází právě v genomu. Studie genetických sekvencí, které kódují tyto proteiny, a studie fenotypů způsobených mutacemi těchto sekvencí byly použity k objasnění membránového transportu sekundárních metabolitů. Tento transport přes membrány je zcela specifický pro každý typ sekundárního metabolitu. Nejen geny účastníci se biosyntézy sekundárních metabolitů, ale také geny obsažené v jejich transportu jsou velmi důležité pro systematické inženýrství zaměřené na vzrůstající produkci velmi cenných sekundárních metabolitů v rostlinách. (22)



Obr. 9 Schéma membránového transportu sekundárních metabolitů a souvisejících ABC transportérů (22)

ABC transportéry (ATP binding cassette)

V mnoha případech vakuolárního vychytávání sekundárních metabolitů bylo dokázáno, že je druhově specifické pro dané komponenty a rostlinné druhy. Většina rostlin obsahuje glykosylované sekundární metabolity. Vakuolární transport glykosylovaných derivátů je obvykle zprostředkován pomocí antiportu proton – substrát. Je však známo i několik případů, kde mohou sekundární metabolity nést také záporný náboj (např. glukuronidy). Flavonové glukuronidy (v šišáku bajkalském je to baicalin) jsou vychytávány pomocí přímé energetické utilizace Mg-ATP. To dokazuje přítomnost ABC transportérů. (23)

Název „ATP binding cassette“ představuje velkou rodinu transmembránových proteinů, nacházejících se v řadě organismů od bakterií po člověka, které vážou ATP a energii z tohoto zdroje využívají k aktivnímu řízenému transportu chemicky různorodých látek z vnitřního prostředí buňky do extracelulárního prostoru. ABC transportéry jsou velmi rozmanitou skupinou proteinů, které zprostředkovávají řadu transportních funkcí. (20, 24, 25)

První ABC transportér byl naklonován v roce 1982 v laboratoři Giovanna Amese. Jednalo se o histidin-permeázu. Od této doby skupina ABC transportérů neustále narůstá a představuje jednu z největších rodin transmembránových proteinů přítomných v mnoha organismech.

ABC transportéry obsahují šest až dvanáct transmembránových helixů a dva hydrofilní helixy uvnitř buňky, které nesou jedno nebo dvě vazebná místa pro ATP (ATP-binding domain/s) a jsou zdrojem substrátové specifity transportního proteinu. V současné době je popisováno 48 ABC transportérů, které se dělí do sedmi podskupin. Nejlépe charakterizovanou skupinou ABC transportérů je podrodina ABCB, konkrétně ABCB-1 (P-glykoprotein/MDR-1).

Nedávné studie prokázaly, že funkce ABC transportérů není omezena jen na detoxikaci. Mimo to jsou důležitou součástí mnoha dalších biologických procesů, jako je buněčná signalizace, což je proces s přísnou substrátovou specifikou. Kromě toho se podílejí na příjmu živin. Tyto všudypřítomné ATP-dependentní pumpy, nebo kanály jsou schopny transportovat obrovské množství substrátů, od malých iontů přes velké proteiny. (26)

Role ABC transportérů při přenosu fenolických sloučenin

Do skupiny fenolických sekundárních metabolitů řadíme jednoduché fenypropanoly (kumaríny, lignany), flavonoidy a polyfenoly, které mají vyšší molekulovou hmotnost (např. taniny). Fenypropanoidy a flavonoidy jsou jedny z nejintenzivněji studovaných rostlinných metabolitů, a to nejen kvůli chemické struktuře, ale zejména kvůli jejich biosyntéze a biologickým účinkům.

Mnoho fenolických sloučenin bylo rozpoznáno v rostlinách v glykosylované formě. Glukosidace hraje klíčovou roli v detoxikaci endogenních sekundárních metabolitů a rovněž xenobiotik v rostlinách. Tyto glykosidy se často shromažďují ve vakuolách.

ABC transportéry a flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny obsažené jak v cévnatých, tak i v bezcévných rostlinách. Při růstu a vývoji rostlin nehrají zásadní roli, ale jsou důležité v jiných oblastech, jako je ochrana rostliny před UV zářením apod.

Kromě ochrany rostliny před UV zářením mají flavonoidy mnoho dalších funkcí – vábí hmyz k opylení a rozptylu semen a regulují auxinový transport.

Výsledky mnoha pokusů ukazují, že místa, kde dochází k akumulaci flavonoidů, jsou rozdílná od těch, kde dochází k biosyntéze těchto sloučenin. To je důkazem, že v rostlinných buňkách probíhá transport flavonoidů. Ačkoliv biosyntéza byla popsána do detailů, transportní a akumulační mechanismy nejsou přesně známy.

Flavonoidy, anthokyany a proanthokyany jsou syntetizovány v cytosolu a shromažďovány ve vakuole. K dokončení tohoto procesu je třeba, aby membránové transportéry přenesly flavonoidy nasyntetizované v cytosolu do vakuoly. Tohoto se účastní několik typů transportérů, z nichž jednu skupinu tvoří ABC transportéry.

Některé sekundární metabolity jsou v cytoplazmě považovány za vysoce reaktivní a potenciálně toxické. K tomu, aby se zabránilo toxicitě, jsou flavonoidy transportovány do vakuol. Rostliny mají vyvinutý detoxikační systém k obraně proti exogenním fytotoxinům, tedy proti xenobiotikům. Hlavní cesta detoxikace se skládá ze tří částí:

1. aktivační fáze, která obvykle zahrnuje hydrolýzu a oxidaci, čímž se xenobiotika stanou reaktivnějšími. Hlavní reakcí v této fázi je katalyzace proteiny cytochromu P450, účastnících se syntézy flavonoidů.
2. konjugační fáze, kde jsou sloučeniny metabolizované v předchozím kroku konjugovány s hydrofilními molekulami, jako je glutathion, glukóza, nebo malonát.
3. rozdělovací fáze, kde jsou konjugáty odděleny od cytosolu pomocí membránových transportních proteinů

Při detoxikaci jsou exogenní látky enzymaticky konjugovány s glutationem. Glutathionové konjugáty jsou pak rozpoznány a pomocí ATP dependentních, na protonovém gradientu nezávislých transportérů (ABC transportéry), transportovány buď do vakuol, nebo do buněčné stěny. V současné době není znám jiný typ transportérů, který by se podílel na kompartmentizaci těchto konjugátů (27, 28)

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

- D – manitol, Ficoll®, Polyethylenglykol 4000, CaCl₂, MgCl₂ : Fluka
- Cellulase onozuka R – 10, Maceroenzyme R – 10: Duchefa Biochemie
- Heses, inositol, kyselina glukuronová, MgATP: Sigma
- chlorid thiaminia puriss., chlorid pyridoxinia puriss.: Koch-Light Laboratories Ltd
- baicalin č., baicalein č., purin, EDTA - Na₂ .: Sigma-Aldrich Chemie
- dihydrofosforečnan draselný č., dusičnan draselný 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 nikotinová č., methanol p.a., molybdenan sodný 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
- hydrolyzát kaseinu: Imuna

4.1.2 Přístroje

- 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
- 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 (5µm) s předkolonkou: Merck, Darmstadt
- třepačka CEROMAT MO: B. Braun Biotech International, Melsungen
- centrifuga MPW 342: Labor-Komplet;MPW Med. Instrument, Varšava

4.2 Kultivace a pasážování suspenzních kultur *S. baicalensis*

4.2.1 Kultivace

Suspenzní kultury byly získány z 9. pasáže kalusových kultur připravených mechanickým rozvolněním částí kořenů vyklíčených rostlin na katedře farmakognózie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. K rozvolnění kořínků bylo použito 25 ml MS média

obsahujícího NAA (naftyloctová kyselina v koncentraci 10 mg.l⁻¹). Kultivace probíhala v 250 ml kulatých baňkách s plochým dnem na rotační třepačce (120 ot. min⁻¹). K vlastním experimentům byla použita 65. až 75. pasáž suspenzních kultur. (9, 14)

Suspenzní kultury šisáku bajkalského byly kultivovány v tekutém médiu podle Murashigeho a Skooga, jehož složení popisuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Složení tekutého média

CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00 mg.ml ⁻¹
KNO ₃	1900,00 mg.ml ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00 mg.ml ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg.ml ⁻¹
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,00 mg.ml ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,84 mg.ml ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,37 mg.ml ⁻¹
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30 mg.ml ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50 mg.ml ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,20 mg.ml ⁻¹
KI	0,83 mg.ml ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg.ml ⁻¹
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,025 mg.ml ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg.ml ⁻¹
Inositol	100,00 mg.ml ⁻¹
Hydrolyzát kaseinu	1000,00 mg.ml ⁻¹
Glycin	2,00 mg.ml ⁻¹
Kyselina nikotinová	0,50 mg.ml ⁻¹
Thiamin hydrochlorid	0,10 mg.ml ⁻¹
Pyridoxin hydrochlorid	0,50 mg.ml ⁻¹
Sacharóza	30000,00 mg.ml ⁻¹

Tato množství byla navážena na analytických vahách. Ty látky, které byly potřebné pouze v malém množství, byly odpipetovány z předem připravených zásobních roztoků. Jako růstový stimulant byla použita naftyloctová kyselina v koncentraci 10 mg l⁻¹.

Takto připravené živné médium bylo po 50 ml rozplněno do 250 ml kulatých baněk s plochým dnem. Tyto baňky byly překryty hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu (15 min., 120°C). (9)

4.2.2 Pasážování

Pravidelné pasážování kultur šišáku bajkalského bylo prováděno v intervalu 12-14 dnů, vlastní kultivace potom probíhala v kultivační místnosti při 25 °C v šestnáctihodinové světelné periodě.

Pasážování spočívalo v přenesení 10-12 ml vzrostlé suspenzní kultury do čerstvého média pomocí pipet, které před tím byly po dobu 15 min sterilizovány při 120°C v autoklávu (před sterilizací byly do pipet vsunuty chomáčky vaty a pipety byly obaleny hliníkovou fólií). Pasážování bylo prováděno v boxu s laminárním prouděním vzduchu, jehož vnitřní povrch byl před vlastní prací vydezinfikován 96% etanolem a ozařován germicidní zářivkou. Po celou dobu pasážování byly dodržovány zásady aseptické práce. (9, 14)

4.3 Izolace vakuol šišáku bajkalského

4.3.1 Izolace protoplastů

Každé izolaci vakuol předchází izolace protoplastů.

4.3.1.1 Roztoky potřebné pro izolaci protoplastů

1. Roztok A: 4,6 g manitolu bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě a doplněno vodou po značku.
2. Roztok enzymů: bylo použito 15 g celulózy a 0,2 g maceroenzymu. Tato množství byla rozpuštěna v roztoku A a doplněna tímto roztokem na 50 ml.

4.3.1.2 Postup izolace protoplastů

1. Suspenzní kultury byly zfiltrány přes Büchnerovu nálevku, promíchány 25 ml roztoku A a opět zfiltrány přes nový filtr. Toto promývání bylo zopakováno třikrát.
2. Asi 18 g čerstvé váhy promytých buněk bylo vloženo do 50 ml roztoku enzymů. Enzymová směs nesměla být starší než 14 dnů.
3. Roztoky byly protřepávány 3 hodiny při 25 °C na rotační třepačce při 120 ot. min⁻¹.

4.3.2 Izolace vakuol

4.3.2.1 Roztoky potřebné k izolaci vakuol

1. Roztok B: 10 mM Hepes obsahující 0,5M manitol, pH 7,4

2. Lyzační roztok: 0,5 mM manitol + 5 mM EDTA + 10 mM Hepes
3. Ficoll 10 %: na 50 ml roztoku bylo použito 5 g ficollu, 0,019 g PEG, 0,12 g Hepes a 1,42 g manitolu
4. Ficoll 5 %: na 50 ml roztoku bylo použito 2,5 g ficollu, 0,019 g PEG, 0,12 g Hepes a 1,42 g manitolu
5. Ficoll 2 %: na 50 ml roztoku bylo použito 1 g ficollu, 0,019 g PEG, 0,12 g Hepes a 1,42 g manitolu
6. Ficoll 15 %: na 50 ml roztoku bylo použito 7,5 g ficollu, 0,019 g PEG, 0,12 g Hepes a 1,42 g manitolu

U všech těchto roztoků byla jako rozpouštědlo použita destilovaná voda.

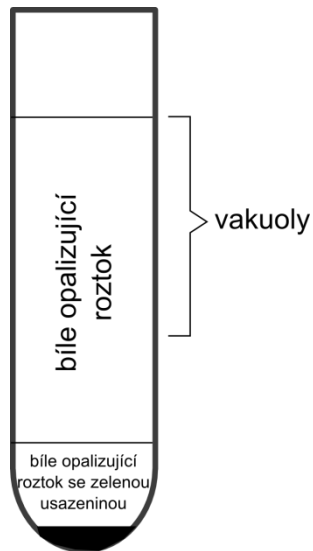
4.3.2.2 *Postup izolace vakuol*

1. Suspenze protoplastů byly centrifugovány v centrifugačních zkumavkách při 2200 ot. min⁻¹ po dobu 10 minut.
2. Usazenina byla rozmíchána v 10 ml roztoku B.
3. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml lyzačního roztoku a roztok byl lyzován 12 minut. Vyplavil se tak buněčný obsah.
4. Do centrifugační zkumavky bylo napipetováno 8 ml 15% Ficollu , ten byl převrstven 8 ml 10% Ficollu, ten byl dále převrstven 15 ml lyzátu (viz bod 3.), a lyzát byl převrstven 5 ml 5% Ficollu.



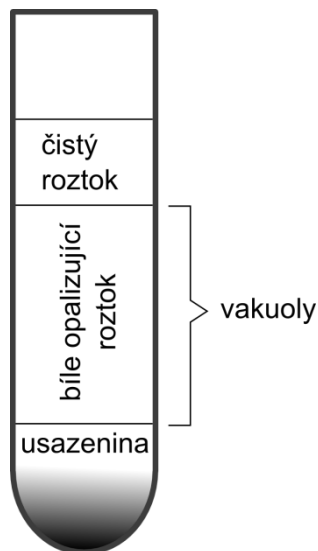
Obr. 10 Zkumavka po navrstvení všech roztoků

5. Takto navrstvené roztoky byly 20 minut při 2200 ot. min⁻¹ centrifugovány.



Obr. 11 Zkumavka po první centrifugaci

6. Z centrifugační zkumavky bylo odebráno 20 - 30 ml směsi (materiál nad spodními vrstvami 15% a 10% ficollu).
7. Do nové centrifugační zkumavky bylo napipetováno 15 ml 10% ficollu, ten byl převrstven předchozí odebranou směsí a ta byla převrstvena 5 ml 2% ficollu.
8. Takto navrstvené roztoky byly 15 minut centrifugovány při 2200 ot. min⁻¹.



Obr. 12 Zkumavka po druhé centrifugaci

9. Po centrifugaci byly ze zkumavky odebrány dvě svrchní vrstvy roztoku a ty byly znovu po dobu 10 minut centrifugovány při 4000 ot. min⁻¹.
10. Sediment obsahoval čisté vakuoly. Supernatant byl odstraněn a vakuoly rozmíchány v roztoku 5% ficollu.

Pro experimenty byla použita laboratorní teplota v kombinaci s vychlazením všech použitých roztoků na 4 °C.

4.4 Sledování transportu mezi vakuolou a vnějším prostředím

Před vlastním pokusem byly vakuoly uchovávané v roztoku 5% ficollu při 4 °C rozděleny do dvou centrifugačních zkumavek a byly centrifugovány při 4000 ot. min⁻¹ po dobu 15 minut.

Po centrifugaci byly vakuoly usazeny na dně zkumavky. Pro jejich získání byl ze zkumavky odstraněn supernatant.

4.4.1 Příprava roztoků potřebných pro pokusy

Byly připraveny pokusné a kontrolní roztoky. Složení těchto roztoků se u jednotlivých zkoušených látek liší (viz níže).

K sedimentu vakuol bylo přidáno 10 ml příslušného roztoku a výsledná směs byla v každé označené zkumavce pečlivě promíchána.

4.4.2 Odběr vzorků

Odběr vzorků v čase 0:

1. Z každé zkumavky byly odebrány 2 ml roztoku a tyto odebrané vzorky byly v označených centrifugačních zkumavkách po dobu 15 min při 4000 ot. min⁻¹ centrifugovány.
2. Injekční stříkačkou byly odebrány vzorky supernatantu a pro HPLC analýzu byly tyto vzorky přeneseny do vialek.
3. Po odstranění zbývajících supernatantu byly k sedimentu vakuol přidány 2 ml metanolu. Směs v obou zkumavkách byla řádně protřepána.
4. Z každé zkumavky byl odebrán vzorek vakuol pro HPLC analýzu vakuolárního obsahu.

Tento postup odebírání vzorků byl prováděn také v čase 2 h, 4 h a 24 h od začátku experimentu. Pomocí HPLC analýzy byl pak sledován obsah jednotlivých flavonoidů během času a za přítomnosti vybraných modulátorů vakuolárního transportu.

4.4.3 Vlastní pokusy

4.4.3.1 Vliv kyseliny glukuronové na vakuolární transport

Kontrolní roztok: ficoll 5%

Pokusný roztok: kyselina glukuronová (0,00195 g/10 ml, odpovídajících 3mM), doplněno roztokem ficollu 5% do 10 ml

4.4.3.2 *Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicaleinu na vakuolární transport*

Kontrolní roztok: baicalein (0,0027 g / 10 ml, odpovídajících 1mM), doplněno roztokem ficollu 5% do 10 ml

Pokusný roztok: baicalein (0,0027 g / 10 ml, odpovídajících 1mM), kyselina glukuronová (0,00195 g / 10 ml, odpovídajících 3mM), doplněno roztokem ficollu 5% do 10 ml

4.4.3.3 *Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicalinu na vakuolární transport*

Kontrolní roztok: baicalin (0,0027 g / 10 ml, odpovídajících 1mM), doplněno ficollem 5%

Pokusný roztok: kyselina glukuronová (0,00195 g / 10 ml, odpovídajících 3mM), baicalin (0,0027 g / 10 ml, odpovídajících 1mM), doplněno roztokem ficollu 5% do 10 ml

4.4.3.4 *Vliv kyseliny glukuronové, MgATP a baicaleinu na vakuolární transport*

Kontrolní roztok: baicalein (0,0055 g / 10 ml), doplněno roztokem ficollu 5% do 10 ml

Pokusný roztok: baicalein (0,0055 g / 10 ml), MgATP (0,0152 g / 10 ml, odpovídajících 3 mM), kyselina glukuronová (0,0019 g / 10 ml), doplněno roztokem ficollu 5% do 10 ml

4.5 HPLC analýza baicaleinu a baicalinu

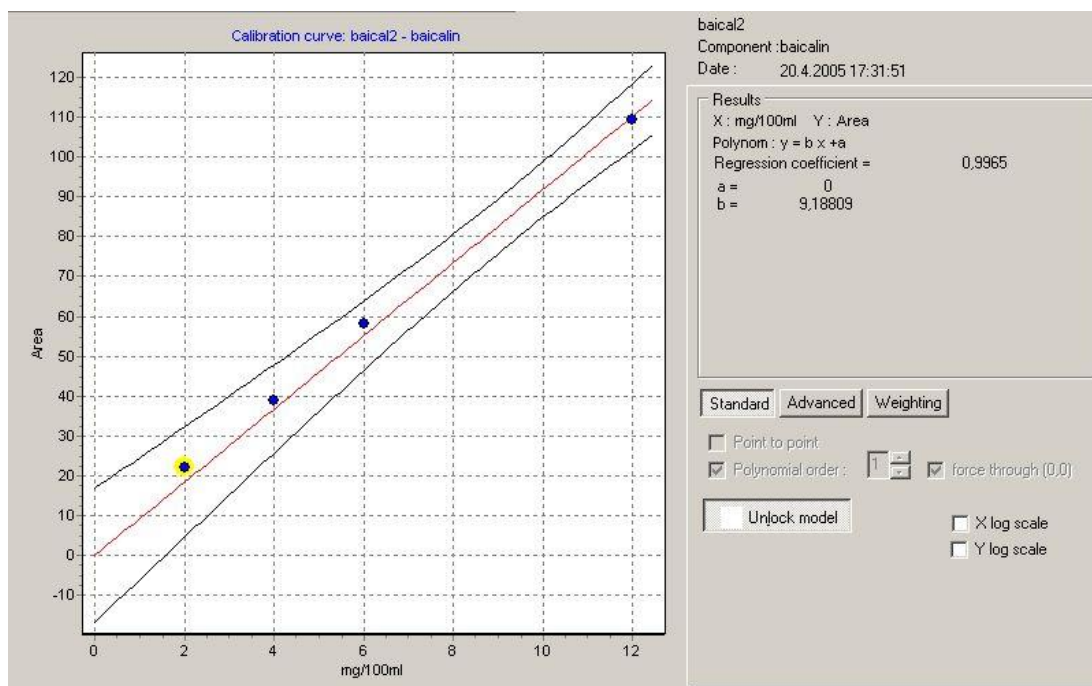
4.5.1 HPLC analýza

Zkoušené i kontrolní roztoky byly přímo nastříkovány do HPLC systému.

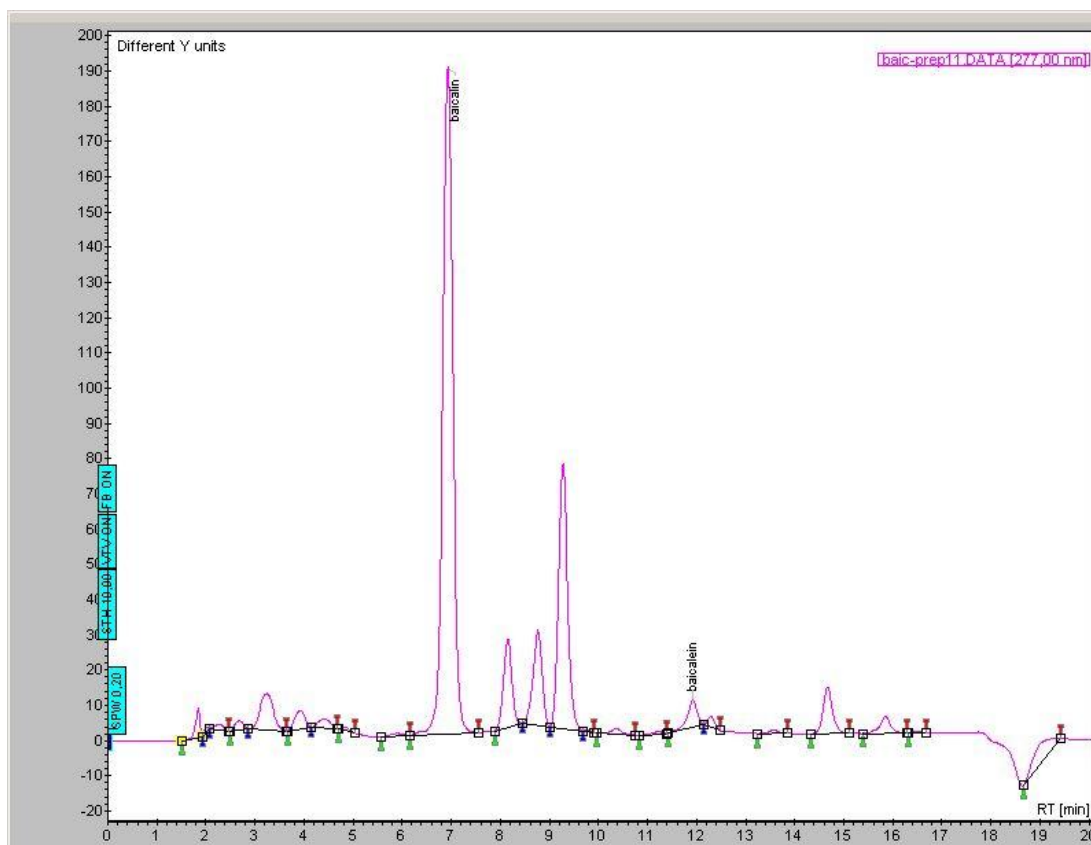
HPLC analýza byla prováděna na sestavě Jasco (čerpadlo PU – 2089, detektor MD – 2055). Sestava byla vybavena předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP – 18, 250x4 µm s ochrannou předkolumnou.

Nastříkovaný objem byl 20 µl. Složení mobilní fáze probíhalo v lineárním gradientu z 50% metanolu s obsahem 0,15% kyseliny fosforečné (pH=2,9) v čase t=0 na 75% metanol s 0,15% kyselinou fosforečnou v čase t=15 min při konstantním průtoku mobilní fáze 1,2 ml.min⁻¹.

Detekce byla prováděna pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190 – 450 nm. Obsah sledovaných flavonoidů byl vyčten z píků při vlnové délce 277 nm, ve které mají oba flavonoidy své absorpční maximum. Retenční časy u baicalinu byl cca 6 minut, u baicaleinu cca 11 minut 40 sekund. Obsah obou látek byl identifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí vnějšího standardu téže látky. (23 str. 27)



Obr. 13 Kalibrační křivka baicaleinu a baicalinu



Obr. 14 Ukázka chromatogramu vzorku

4.5.2 Validace HPLC analýzy

Validace je ověření platnosti zvoleného analytického postupu.

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC soustavy (Jasco) podle normy ISO 9001 (International Organisation for Standardisation). Způsoblost chromatografického systému 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.

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, porovnáváním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáváním s referenčním materiálem).

- Kvantitativní limit – jde o nejmenší koncentraci, která je kvantifikovatelná s přijatelnou přesností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %). (23)

4.6 Statistické zpracování výsledků

Statistická významnost naměřených výsledků byla vypočítána pomocí t – testu významnosti dvou průměrů (pro rovnost rozptylů) podle následujících matematických vztahů:

Aritmetický průměr:

$$X = \frac{\sum_{i=1}^a x_i}{a}$$

X...aritmetický průměr

x_i ...naměřené hodnoty

a...rozsah souboru

Směrodatná odchylka:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^a (x - x_i)^2}{a - 1}}$$

x...aritmetický průměr

x_i ...naměřené hodnoty

a...rozsah souboru

Testovací kritérium:

$$T = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{a_1 * s_1^2 + a_2 * s_2^2}} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2 * (a_1 + a_2 - 2)}{a_1 + a_2}}$$

x_1 ...aritmetický průměr kontrolního souboru

x_2 ...aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 ...směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 ...směrodatná odchylka pokusného souboru

a_1 ...počet členů kontrolního souboru

a_2 ...počet členů pokusného souboru

Testovací kritérium přísluší t – rozdělení se stupněm volnosti vypočteným podle vzorce $V = a_1 + a_2 - 2$.

Pokusný soubor se od kontrolního souboru významně liší v případě, že vypočtené testovací kritérium je větší než kritická hodnota t_p pro vypočtený stupeň volnosti v v hladině významnosti p ($p=0,05$)

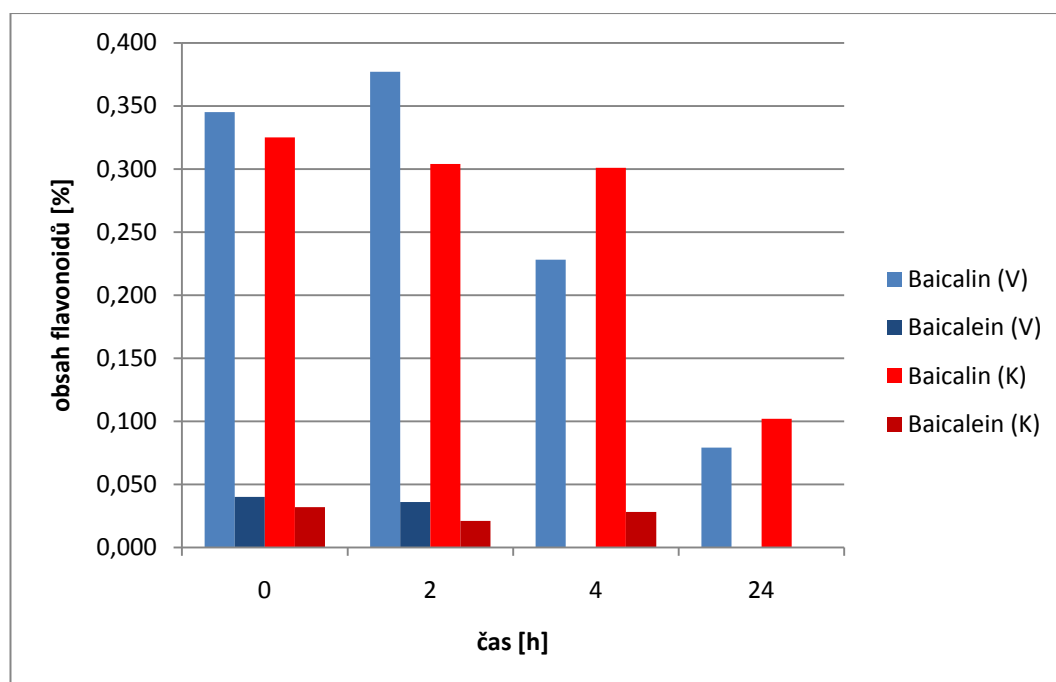
5 Výsledky

Výsledky všech analýz baicalinu a baicaleinu ve vakuolách a supernatantu jsou uvedeny ve formě tabulek a grafů a jsou průměrem tří stanovení.

5.1 Vliv kyseliny glukuronové na obsah flavonoidů

Tabulka 2 Vliv kyseliny glukuronové na obsah flavonoidů ve vakuolách

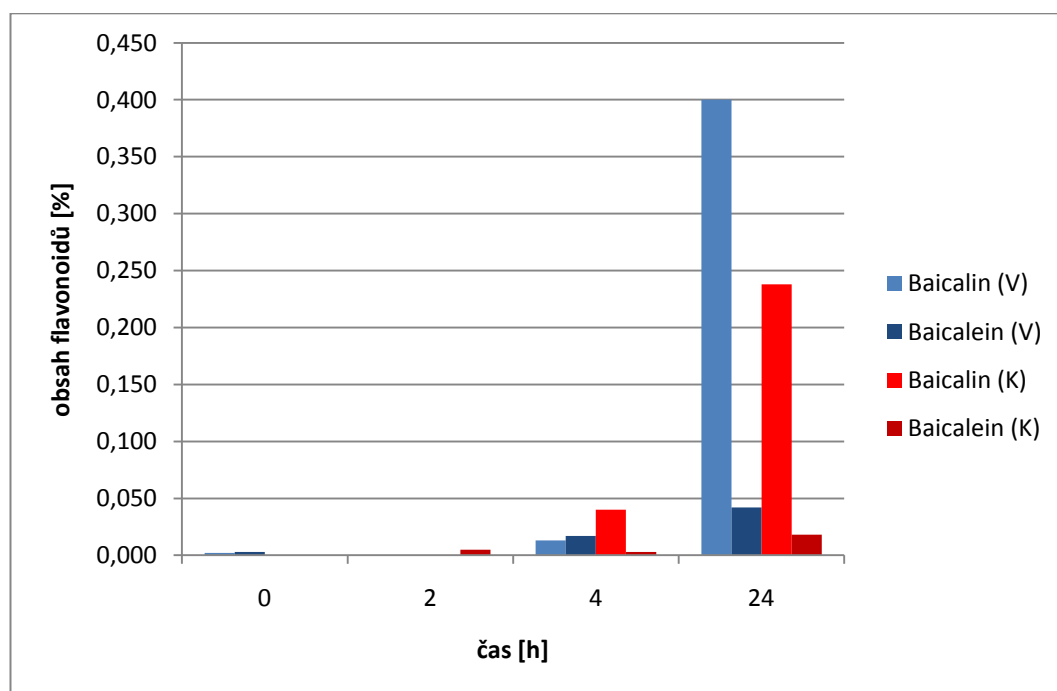
Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	0,345	0,040	0,325	0,032
2	0,377	0,036	0,304	0,021
4	0,228	0,000	0,301	0,028
24	0,079	0,000	0,102	0,000



Obr. 15 Vliv kyseliny glukuronové na obsah flavonoidů ve vakuolách

Tabulka 3 Vliv kyseliny glukuronové na obsah flavonoidů v supernatantu

Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	0,002	0,003	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,005
4	0,013	0,017	0,040	0,003
24	0,400	0,042	0,238	0,018

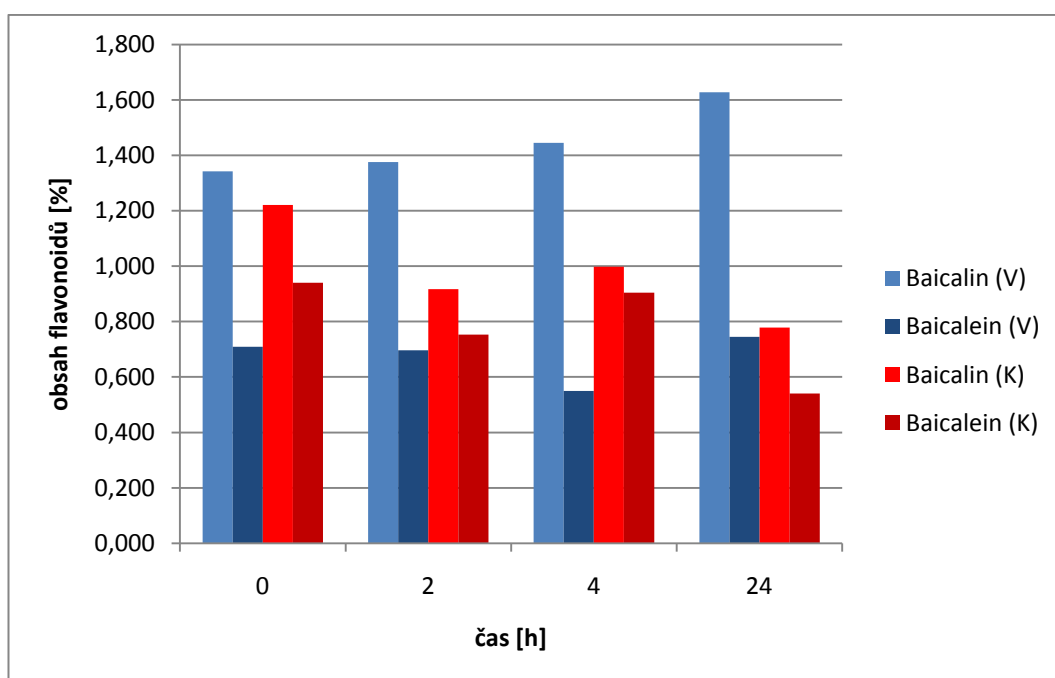


Obr. 16 Vliv kyseliny glukuronové na obsah flavonoidů v supernatantu

5.2 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicaleinu na obsah flavonoidů

Tabulka 4 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicaleinu na obsah flavonoidů ve vakuolách

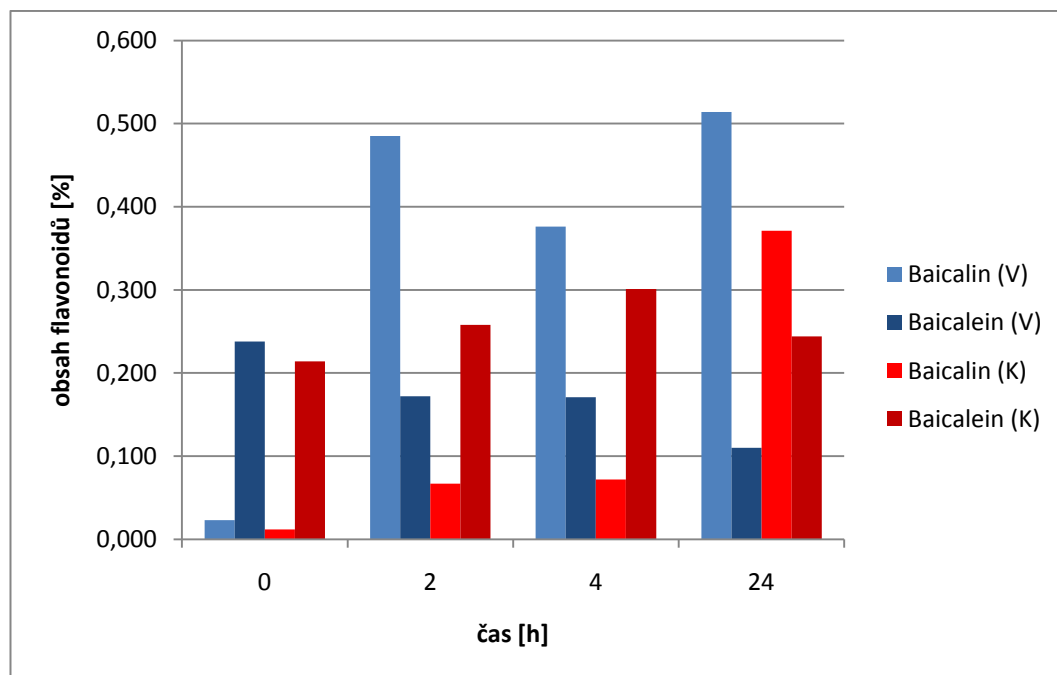
Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	1,342	0,709	1,221	0,940
2	1,376	0,696	0,917	0,753
4	1,445	0,550	0,998	0,904
24	1,627	0,745	0,778	0,541



Obr. 17 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicaleinu na obsah flavonoidů ve vakuolách

Tabulka 5 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicaleinu na obsah flavonoidů v supernatantu

Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	0,023	0,238	0,012	0,214
2	0,485	0,172	0,067	0,258
4	0,376	0,171	0,072	0,301
24	0,514	0,110	0,371	0,244

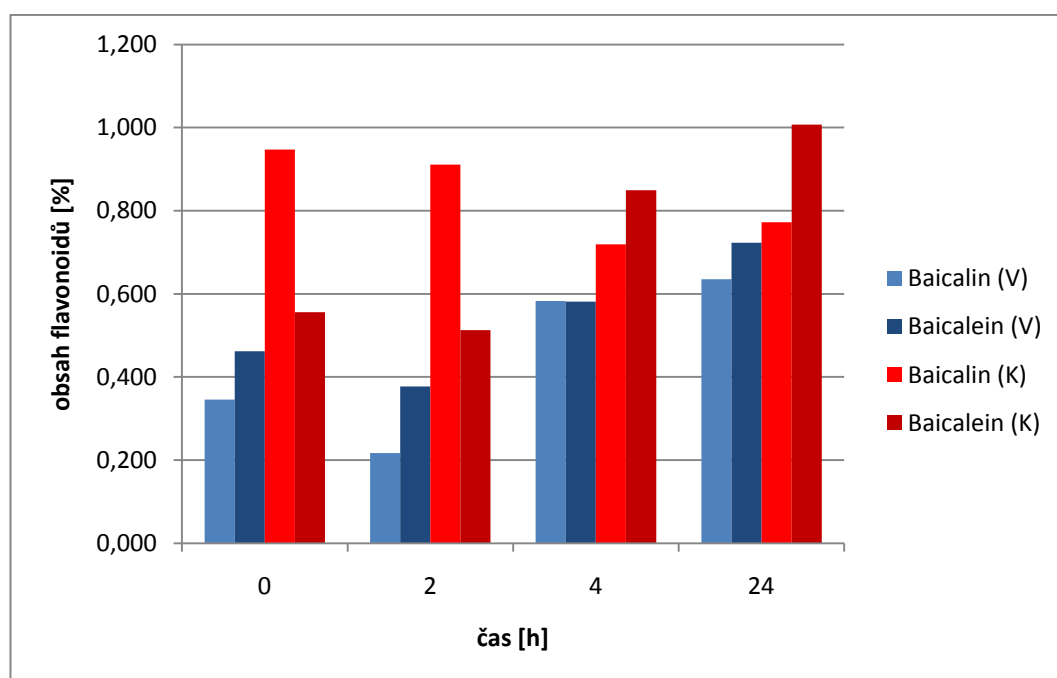


Obr. 18 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicaleinu na obsah flavonoidů v supernatantu

5.3 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicalinu na obsah flavonoidů

Tabulka 6 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicalinu na obsah flavonoidů ve vakuolách

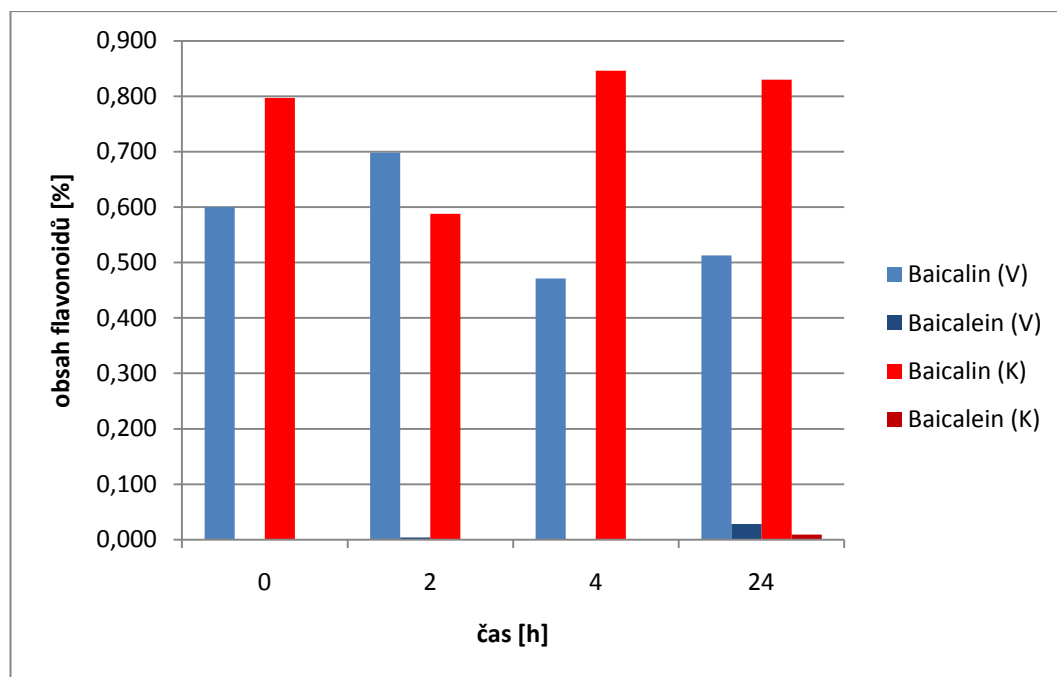
Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	0,346	0,462	0,947	0,556
2	0,217	0,377	0,911	0,513
4	0,583	0,581	0,719	0,849
24	0,635	0,723	0,772	1,007



Obr. 19 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicalinu na obsah flavonoidů ve vakuolách

Tabulka 7 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicalinu na obsah flavonoidů v supernatantu

Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	0,600	0,001	0,797	0,000
2	0,698	0,004	0,588	0,001
4	0,471	0,000	0,846	0,000
24	0,513	0,028	0,830	0,009

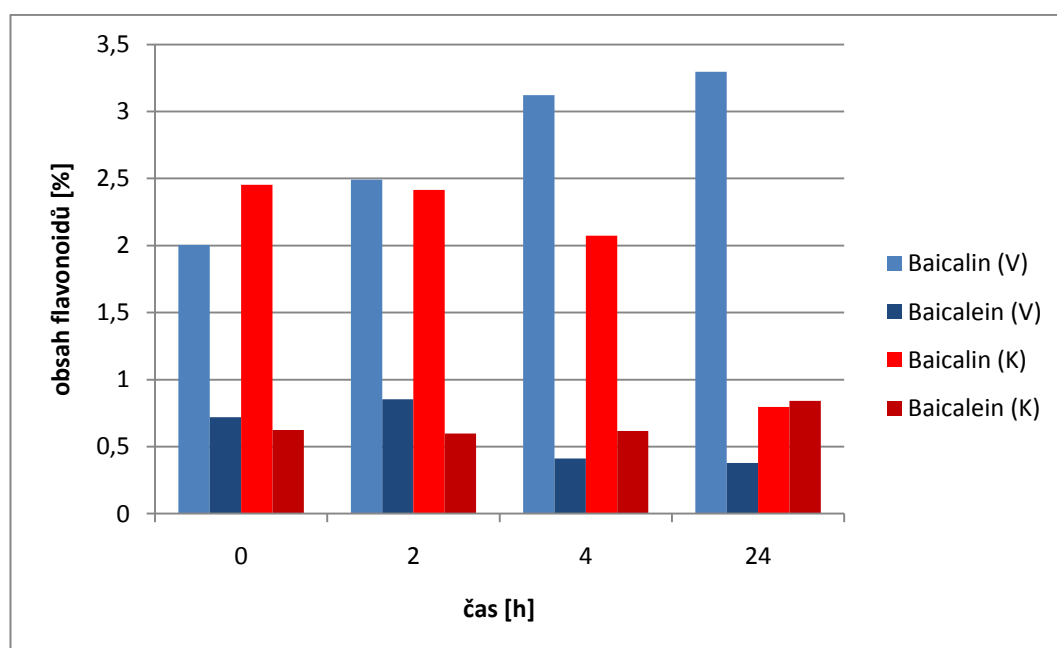


Obr. 20 Vliv kyseliny glukuronové v přítomnosti baicalinu na obsah flavonoidů v supernatantu

5.4 Vliv kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP na obsah flavonoidů

Tabulka 8 Vliv kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP na obsah flavonoidů ve vakuolách

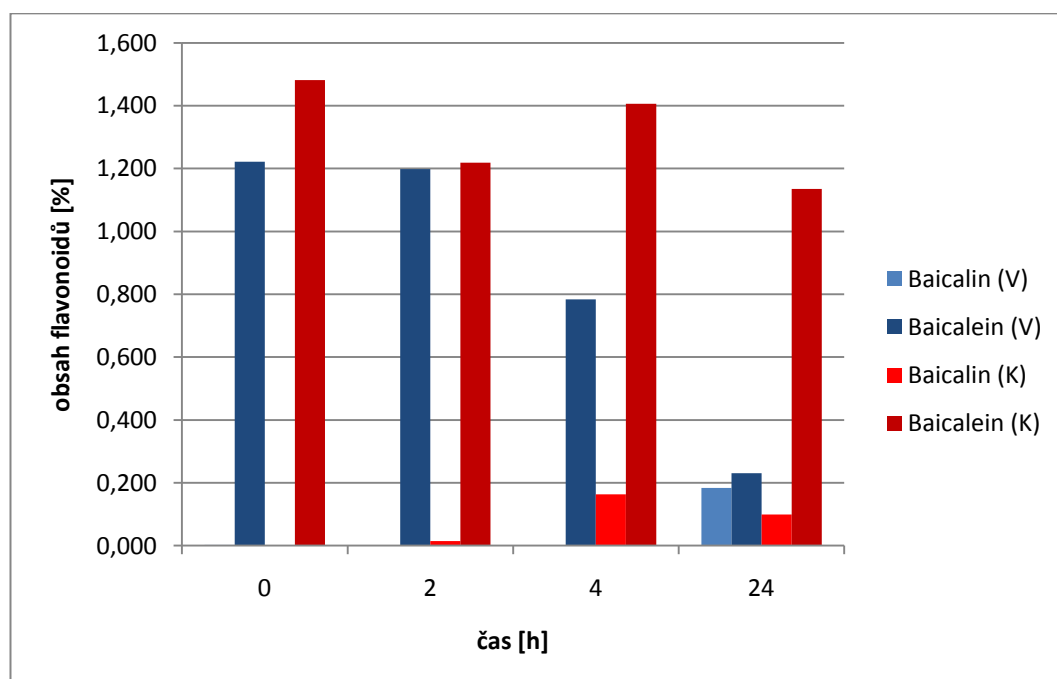
Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	2,003	0,719	2,452	0,623
2	2,492	0,854	2,415	0,598
4	3,121	0,412	2,074	0,616
24	3,295	0,377	0,796	0,841



Obr. 21 Vliv kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP na obsah flavonoidů ve vakuolách

Tabulka 9 Vliv kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP na obsah flavonoidů v supernatantu

Čas [h]	Vzorek		Kontrola	
	Baicalin [%]	Baicalein [%]	Baicalin [%]	Baicalein [%]
0	0,002	1,222	0,000	1,481
2	0,000	1,198	0,015	1,219
4	0,000	0,784	0,163	1,406
24	0,184	0,231	0,099	1,135



Obr. 22 Vliv kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP na obsah flavonoidů v supernatantu

6 Diskuze

V šišáku bajkalském jsou flavonoidy syntetizovány na endoplazmatickém retikulu. Mechanismus transportu flavonoidů uvnitř buněk není zatím přesně znám, ale z předchozích studií je zřejmé, že se uskládají ve vakuolách. Předpokládá se transport ve formě glukuronidů, nebo glutationových konjugátů, které vznikají na vnější straně tonoplastu. Tato diplomová práce si kladla mimo jiné za cíl ověřit tuto teorii a zjistit, zda se na baicalein váže kyselina glukuronová a zda je transport ve formě glukuronidu ovlivněn MgATP. (23, 24)

Transport opačným směrem, tzn. z vakuoly do cytosolu, rovněž není důkladně prostudován. Spouštěcí mechanismus zřejmě souvisí s náhlými potřebami buňky. Je-li buňka vystavena oxidačnímu stresu, baicalin zřejmě ztrácí cukernou složku a přechází zpět na baicalein, který přestoupí přes tonoplast do cytosolu. Zatím není jasné, jestli se zde váže na další látky usnadňující jeho transport a rozpustnost v cytosolu. Roli by zde mohl hrát glutation. V cytosolu baicalein reaguje s kyslíkovým radikálem a pomocí peroxidáz je přeměněn na 6,7-dehydrobaicalein. (23)

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv vybraných potenciálních aktivátorů a inhibitorů transportních mechanismů na transport flavonoidů přes tonoplast.

První testovanou látkou byla kyselina glukuronová. Samotná kyselina glukuronová neměla prakticky žádný vliv na obsah baicalinu a baicaleinu ve vakuolách. Pouze u vzorku odebraného v čase 24 h došlo k významnějšímu poklesu obsahu baicalinu a baicaleinu ve vakuolách, což se projevilo zvýšením jejich obsahu v supernatantu. Totéž bylo v menší míře pozorováno také u kontroly (Tabulka 2; Obr. 15; Tabulka 3; Obr. 16). Příčinou zvýšeného množství sledovaných flavonoidů v supernatantu je pravděpodobně částečný rozpad vakuol v průběhu experimentu a uvolnění vakuolárního obsahu do okolního prostředí.

Vakuoly izolované z této pasáže obsahovaly jen minimální množství baicaleinu. Z tohoto důvodu nebylo možné zjistit, jestli se kyselina glukuronová spojuje s intravakuolárním baicaleinem.

V následujícím experimentu byl testován vliv kyseliny glukuronové spolu s baicaleinem. Kombinace těchto dvou látek měla mírně pozitivní vliv na obsah baicalinu ve vakuolách. Obsah baicalinu vzrostl z 1,34 % na 1,63 %, zatímco obsah v kontrole naopak

klesl. Je tedy pravděpodobné, že pomocí tonoplastových proteinů dochází ke sloučení kyseliny glukuronové a baicaleinu a výsledný konjugát je transportován do vakuoly (Tabulka 4; Obr. 17). S tím koresponduje i pokles obsahu baicaleinu v supernatantu.

Zvýšení množství baicalinu v supernatantu u kontroly v čase 24 h lze vysvětlit postupnou degradací vakuol v průběhu experimentu. U vzorku došlo k nárůstu baicalinu v supernatantu již po dvou hodinách. Z toho se dá usuzovat, že se může jednat i o samovolný únik baicalinu mimo neporušenou vakuolu (Tabulka 5; Obr. 18).

Dále bylo sledováno, zda na transport flavonoidů má vliv kyselina glukuronová v kombinaci s baicalinem. Látky v této kombinaci způsobují mírný vzestup baicalinu uvnitř vakuol. Vzhledem k tomu, že ve vakuolách došlo i ke zvýšení množství baicaleinu, lze usuzovat, že v tomto případě baicalin nevznikl syntézou z baicaleinu, ale že do vakuoly byl jednoduše transportován z vnějšího prostředí.

U kontroly tento jev nebyl pozorován. To může naznačovat, že kyselina glukuronová má vliv i na vlastní transport baicalinu přes tonoplast (Tabulka 6; Obr. 19)

V přítomnosti kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP došlo pravděpodobně ke spojení baicaleinu a kyseliny glukuronové na glykosid baicalin a k jeho transportu do vakuol. Ve vakuolách současně sledován pokles obsahu baicaleinu. V případě kontroly obsah baicalinu ve vakuolách klesá. Tento proces je patrný již u kombinace kyseliny glukuronové a baicaleinu. V přítomnosti MgATP se tento transport projevil již po dvou hodinách. Z toho vyplývá, že MgATP tento transport urychluje (Tabulka 8; Obr. 21).

Tyto výsledky nastolují otázku, zda se baicalin syntetizuje z baicaleinu na vnitřní nebo vnější straně tonoplastu. Úbytek baicaleinu je patrný jak v supernatantu (tedy ve vnějším prostředí), tak uvnitř vakuoly.

Teorii o spojení baicaleinu s kyselinou glukuronovou na vnější straně tonoplastu a jejich transportu do vakuoly podporuje fakt, že v supernatantu je úbytek baicaleinu daleko výraznější.

Malé množství baicalinu se objevuje v supernatantu vzorku a kontroly v čase odběru 24 hodin (u kontroly i u času 4 hodiny). To může být způsobeno rozpadem vakuol během experimentu a uvolněním vakuolárního obsahu do okolního prostředí, což bylo pozorováno i u předešlých pokusů.

Vliv MgATP na transportní formu flavonoidů sledovala ve své diplomové práci i Zuzana Kršková. Z jejích výsledků vyplývá, že Mg ATP má na obsah flavonoidů v suspenzních kulturách pozitivní vliv.

Zmíněné experimenty však byly prováděny na celých buňkách a sledovaly pouze obsah flavonoidů uvnitř buněk. Tato práce je tedy také doplněním těchto poznatků a v podstatě lokalizuje místo konečné syntézy baicalinu na vakuolární membránu.

Závěrem lze konstatovat, že pozitivní vliv MgATP a kyseliny glukuronové na obsah baicalinu ve vakuolách dokazuje přítomnost ABC transportérů v tonoplastech šišáku bajkalského. Tyto transportéry jsou zodpovědné za syntézu baicalinu z bacaleinu a k. glukuronové a za transport baicalinu do vakuoly.

7 Závěr

1. Byla zvládnuta kultivace suspenzních kultur Šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis*, *Lamiaceae*) a izolace vakuol z těchto kultur.
2. Byla zvládnuta HPLC analýza baicalinu a baicaleinu.
3. Byl sledován vliv vybraných potenciálních aktivátorů a inhibitorů transportních mechanismů na transport flavonoidů přes tonoplast.
4. Na rychlost transportu sledovaných flavonoidů přes tonoplast má pozitivní vliv kombinace kyseliny glukuronové, baicaleinu a MgATP. K prvnímu výraznějšímu zvýšení obsahu baicalinu ve vakuolách došlo již v čase 2 hodiny (z 2,003 % na 2,492 %). V čase 24 hodin byl obsah baicalinu ve vakuolách již 3,295 %. V kontrole naopak došlo k poklesu baicalinu z 2,452 % v čase 0 hodin na 0,796 % v čase 24 hodin. Z toho je možné usuzovat, že tyto procesy jsou závislé na zdroji energie v podobě MgATP.
5. Naopak samotná kyselina glukuronová na metabolismus a transport flavonoidů nemá prakticky žádný vliv.
6. Z dosažených výsledků vyplývá, že kyselina glukuronová se s velkou pravděpodobností váže na vnější straně tonoplastu na molekulu baicaleinu a výsledný glukuronid baicalin je transportován přes tonoplast. MgATP jako zdroj energie pro transportér pozitivně ovlivnil tento transport. Transportní systém pro baicalin a baicalein tedy náleží ke skupině ABC transportérů.

8 Abstrakt

Kamila Táboříková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008

Ovlivnění metabolismu a transportu flavonoidů v kulturách *in vitro* I

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.

Počet stran: 57

Tato diplomová práce s názvem Ovlivnění metabolismu a transportu flavonoidů v kulturách *in vitro* I se zabývá vlivem vybraných látek na ukládání flavonoidů ve vakuolách a sleduje vliv těchto látek na transport flavonoidů mezi vakuolou a vnějším prostředím.

K experimentům byly použity vakuoly izolované ze suspenzních kultur šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis*, *Lamiaceae*).

Po provedení všech experimentů bylo zjištěno, že transport flavonoidů je nejvíce ovlivněn kyselinou glukuronovou v kombinaci s baicaleinem a MgATP. V přítomnosti kyseliny glukuronové a baicaleinu dochází pomocí endomembránových proteinů k syntéze baicalinu a k jeho ukládání do vakuol. MgATP tento proces ještě více zintenzivňuje a urychluje.

Klíčová slova: šišák, *Scutellaria*, vakuoly, izolace vakuol, baicalin, baicalein, kyselina glukuronová, MgATP

9 Abstract

Kamila Táboříková

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Effects on flavonoid metabolism and transport in in vitro cultures I

Diploma thesis

Supervisor: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.

Page Count: 57

This thesis deals with dependency of flavonoids storage in vacuoles on selected compounds. The dependency of transport between vacuole and its environment was also investigated.

The experiments were proceeded with vacuoles from suspension cultures of *Scutellaria baicalensis* of the *Lamiaceae* family.

The transport of flavonoids was observed to be influenced by glucuronic acid in presence of baicalein and MgATP. The glucuronic acid and baicalein cause the baicalin synthesis on endomembrane proteins and its storing in vacuoles. This process is getting more intensive and rapid in the occurrence of MgATP.

Keywords: Baikal Skullcap, *Scutellaria*, vacuoles, isolation of vacuoles, baicalin, baicalein, glucuronic acid, MgATP

10 Citovaná literatura

1. **L. Opletal, J. Volák**, *Rostliny pro zdraví*. Praha : Aventinum, 1999
2. **D. Dugas**, *500 nejlepších receptů lidové medicíny*. Ostrava : Knižní expres, s.r.o., 2007
3. **J. Kováč**, *Explantátové kultury rostlin*. Olomouc : Univerzita Palackého, 1995
4. **P. Valíček et al.**, *Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny*. Praha : Svítání, 1998
5. **Kolektiv autorů**, *1000 bylin*. Praha : Svojtka, 2007
6. **J. Martin, J. Dušek**, *Protizánětlivý účinek šiřáku bajkalského. Praktické lékárenství* . 2005, Sv. 1, str. 27-28
7. **J. Acrimovičová**, *Bylina perspektivní pro léčbu rakoviny. Regenerace*. 2005, Sv. 13, str. 4.
8. **V. Ďurina, Vladimír**, *Zázraky fytoterapie. Regenerace*. 2005, Sv. 15, str. 8
9. **Š. Ševčíková**, *Izolace vakuol ze suspenzních kultur Scutellaria baicalensis Georgii, Diplomová práce*. 2008, Hradec Králové
10. **J. Hubík, J. Dušek, J. Spilková, J. Šícha**, *Obecná farmakognosie II*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství Praha
11. **B. Sikyta, J. Dušek**, *Biotechnologie pro farmaceuty*. Praha : Karolinum, 2001
12. **V. Deščíková**, *Transport flavonoidů přes buněčné membrány I., Diplomová práce*. 2007, Hradec Králové
13. **J. Šebánek, Z. Sladký, S. Procházka**, *Experimentální morfologie rostlin*. Praha: Academia, 1983
14. **C. Šmolíková**, *Stabilita vakuol ze suspenzních kultur Scutellaria baicalensis Georgii, Diplomová práce*. 2008 Hradec Králové
15. **J. Blažíčková, Jitka**. *Roslinné explantátové kultury a jejich využití pro studium biologie telomer, Bakalářská práce*. 2007 Brno
16. **J. Pazourek, O. Votrubová**, *Atlas of plant anatomy*. Praha : Peres publishers, 1997
17. **T. Ma et al.**, *Tonoplast H⁺ ATPase in response to salt stress in Populus euphratica cell suspensions. Plant Science*. 2002, Sv. 163, str. 499-505

18. http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/membrany_fd.doc, poslední návštěva 26. 4. 2009
19. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Tonoplast>, poslední návštěva 26. 4. 2009
20. **F. L. Theodolou**, *Plant ABC transporters. Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, Sv. 1465, str. 79-103
21. **B. J. Brankla, O. Pantoja**, *Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996, Sv. 47, str. 159-184
22. **K. Yazaki**, *ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. FEBS letters*. 2006, Sv. 580, str. 1183-1191
23. **Z. Kršková**, *Transport flavonoidů přes buněčné membrány II., Diplomová práce*. 2008 Hradec Králové
24. **M. Dostálek**, *Transportní proteiny rodiny ABC. Farmakoterapie*. 2005, Sv. 6, str. 621-624
25. **K. Yazaki**, *Transporters of secondary metabolites. Current Opinion in Plant Biology*. 2005, Sv. 3, str. 301-307
26. **L. Schmitt, R. Tampé**, *Structure and mechanism of ABC transporters. Current Opinion in Structural Biology*. 2002, Sv. 6, str. 754-760
27. **S. Kitamura**, *Transport of flavonoids, The Science of Flavonoids*. Columbus : Springer, 2005
28. **W. A. Peer, A. S. Murphy**, *Flavonoids and auxin transport. Trends in Plant Science*. 2007, Sv. 12, str. 556-563
29. **V. Jirásek, F. Starý, F. Severa**, *Kapesní atlas léčivých roslin*. Praha : Státní vědecké nakladatelství Praha, 1986