

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

Eva Adamová

SILYBUM MARIANUM *IN VITRO* – ABIOTICKÁ ELICITACE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Datum zadání:	24. 11. 2009
Vedoucí katedry:	Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, Csc.
Vedoucí diplomové práce:	Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, Csc.
Termín odevzdání:	14. 05. 2011
Počet stran:	60
Oponent diplomové práce:	PharmDr. Jan Martin, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Doc. PharmDr. Lence Tůmové, Csc. za odborné vedení mé diplomové práce. Také děkuji ostatním pracovníkům katedry farmakognozie za pomoc a vytvoření výborných pracovních podmínek.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1. Metody kultivace rostlinných tkání a buněk	7
3.1.1. Explantátové kultury	7
3.1.2. Kultivace explantátových kultur	7
3.1.3. Složení kultivačních médií pro explantátové kultury	8
3.1.4. Využití explantátových kultur	13
3.1.5. Množení nepřímou organogenezí	13
3.1.6. Mikropropagace rostlin	14
3.1.7. Buněčné suspenzní kultury	15
3.2. Stres rostlin a fyziologie stresu	16
3.3. Stresové faktory	18
3.4. Reakce rostlin na stresové faktory	18
3.5. Mechanismy stresových reakcí	20
3.6. Produkce sekundárních metabolitů-elicítace a elicitory	22
3.7. <i>Silybum marianum</i>	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1. Biologický materiál	28
4.2. Pomocné látky a chemikálie	28
4.3. Přístroje a vybavení	29
4.4. Složení a příprava živného média	30
4.5. Kultivace kultur	31
4.6. Elicitace elektrickým proudem	31
4.7. Stanovení obsahu	32
4.8. Statistické zpracování výsledků	38
5. VÝSLEDKY	40
6. DISKUZE	53
7. ZÁVĚR	56

8. SEZNAM LITERATURY	57
9. ABSTRAKT	60

1. ÚVOD

Rostliny obsahují velké množství přírodních látek, které jsou využívány v potravinářství, medicíně a kosmetice. V posledních letech dochází k velkému poklesu cenných zdrojů přírodních surovin, což může být zapříčiněno mnoha faktory, jako např. omezením kultivačních ploch pro rostliny, napadením rostlin infekcemi a i citlivost na různorodé klimatické podmínky může ovlivnit produkci rostlin. V posledních letech je snaha zajistit přírodní suroviny využitím biotechnologických metod.

Elicitace je jedním z procesů vedoucím ke zvýšení hladiny enzymů a následně dochází ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů. Na druhé straně jsou rostliny vystaveny širšímu spektru stresových faktorů, které však působí mnohdy velmi lokalizovaně. Systémové reakce celého organismu nejsou v tom případě nutné (1).

Platnost hypotézy obecné stresové reakce také oslabuje značná nejednotnost ve způsobech zachycování a převádění signálu od receptorů k efektorům, tedy k vlastnímu spuštění stresové reakce. I když často bývají do těchto aktivit zapojeny společné „stresové“ fytohormony, receptory lokalizované v membránách a také celý navazující vnitrobuněčný řetěz přenašečů signálu, přesto některé stresory k indukci stresové reakce membránové receptory nepotřebují (např. oxid siřičitý, těžké kovy, UV záření atd.). U biotických stresů spojených s průnikem patogenů do buňky je způsob indukce stresové reakce zvláště nejednotný (1).

Poznání mechanismu fyziologicky identifikovaných stresových reakcí na molekulární a biochemické úrovni je předpokladem pro cílené získávání odolnějších genotypů polních plodin i ostatních rostlin významných z hlediska společenských potřeb (1).

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo zjistit vliv abiotické elicitace na produkci jednotlivých složek silymarinového komplexu v suspenzní kultuře *Silybum marianum.L.*

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Metody kultivace rostlinných tkání a buněk

3.1.1 Explantátové kultury (4)

Jako explantátové kultury se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů izolovaných z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Explantáty se využívají jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů. Výhodou je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk.

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 28 °C

Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Obsah růstových látek a vitamínů v živné půdě má rozhodující význam nejen pro růst kalusové kultury, ale i pro převádění kalusu do suspenzní kultury. Zejména rozpadavý kalus po přenesení do tekuté živné půdy zajišťuje homogenitu suspenzní kultury, která je pro další vývoj postupu nezbytná.

3.1.2 Kultivace explantátových kultur (4)

Volba vhodného kultivačního zařízení pro přípravu explantátových kultur rostlinných buněk má značný význam. Při šetrném, avšak nedostatečném způsobu promíchávání explantátové kultury mohou být metabolické procesy limitovány kyslíkem. Vhodným zařízením jsou rollery nebo třepačky.

3.1.3 Kultivační média pro explantátové kultury

Složení médií (2)

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je složení kultivačního média.

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, další nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory. Existuje celá řada médií používaných pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace.

Makroelementy (2)

Makroelementy dodávané do kultivačních médií zahrnují šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu.

Kultivační médium by mělo obsahovat přinejmenším 25-60 mM anorganického dusíku. Rostlinné buňky mohou růst na médiu obsahujícím dusík pouze v nitrátové formě, ale mnohem lepšího růstu je většinou dosaženo je-li dusík do média dodáván společně v nitrátové formě a ve formě amonných solí. Redukovaná forma dusíku je pro některé druhy pro zajištění růstu v explantátové kultuře nezbytná. Redukovaný dusík se může do média přidávat také ve formě organických sloučenin (např. aminokyseliny). Nitráty se dávají obvykle do média v koncentraci 25-40 mM, amonium se obvykle v koncentraci 2-20 mM. Dusík se do kultivačního média nejčastěji dodává ve formě dusičnanu draselného a dusičnanu amonného.

Draslík se do médií dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu v koncentraci 20-30 mM. Optimální koncentrace fosforu, hořčíku, síry a vápníku se pohybuje v rozsahu 1-3 mM.

Mikroelementy (2)

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin patří železo, mangan, zinek, bor, měď a molybden. Železo a zinek se obvykle do

médií dodávají v chelátové formě. Do médií se také někdy přidává kobalt, jód, sodík a chlór, ale nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné. Měď a kobalt se obvykle přidávají do médií v koncentraci 0,1 μM , železo 100 μM , molybden v koncentraci 1 μM , jod 5 μM , zinek 5-30 μM , mangan 20-90 μM a bór 25-100 μM .

Zdroj uhlíku (2)

Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. V kultivačních médiích byly testovány i jiné sacharidy jako laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza a škrob, ale většinou byly méně efektivní než sacharóza a glukóza. Obvykle používaná koncentrace sacharózy v kultivačním médiu je 2-3%.

Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů. Schopnost explantátů vyživovat se autotrofně je totiž velmi omezena.

Sacharóza přítomná v médiu může být rozštěpena na glukózu a fruktózu. K částečné hydrolyze sacharózy dochází také při autoklávování média.

Vitamíny (2)

Normální rostlina sama syntetizuje vitamíny nezbytné k jejímu růstu a vývoji. Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin, a myo-inositol. Thiamin se používá obvykle v koncentraci 0,1-10 mg/l. Thiamin je součástí většiny médií a je pro růst tkáňových kultur nepostradatelný. Kyselina nikotinová a pyridoxin se rovněž velmi často dodávají do kultivačních médií, ale jejich přítomnost v kultivačním médiu není tak nezbytná jako u thiaminu. Kyselina nikotinová se používá v koncentraci 0,1-5,0 mg/l, pyridoxin 0,1-10,0 mg/l.

Myo-inositol se vyskytuje ve většině živných médií. Jedná se o sacharid, který nemusí být pro růst explantátů nezbytný, ale může tento růst stimulovat. Předpokládá se jeho účast na tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které

hrají roli v buněčném dělení. Myo-inositol se v kultivačních médiích používá v koncentraci 50-5000 mg/l.

Součástí kultivačních médií jsou další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin atd. Jejich přítomnost v médiích však není většinou nezbytná.

Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku (2)

Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých aminokyselin v živném médiu stimulovat růst explantátů. Aminokyseliny se dodávají do živných médií především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku a mohou být přímo využívány k syntéze proteinů.

Velmi často se používá také L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin. Kasein hydrolyzát se používá obvykle v koncentraci 0,05-0,1%.

Pokud se dodávají aminokyseliny samotné, je nutné mít na zřeteli, že mohou při vyšších koncentracích také inhibovat růst. Koncentrace aminokyselin stimulující růst závisí na druhu aminokyseliny. Nejčastěji se používá koncentrace v rozsahu 1-100 mg/l.

Nedefinované organické složky médií (2)

Růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Použití těchto nedefinovaných směsí je však lépe pokud možno vynechat právě z důvodů jejich nedefinovaného složení. Nejčastěji se používá protein (kasein) hydrolyzát a kokosové mléko. Protein hydrolyzát v koncentraci 0,05-0,1% a kokosové mléko v koncentraci 5-20%.

Do médií se také někdy dodává aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Aktivnímu uhlí se připisují tři základní funkce v živném médiu: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média. Inhibici růstu v přítomnosti aktivního uhlí v médiu je možné vysvětlit absorpcí růstových regulátorů aktivním uhlím.

Stimulační účinek aktivního uhlí na růst explantátů je připisován jeho schopnosti vázat toxické fenolické sloučeniny produkované rostoucím explantátem. Aktivní uhlí se před použitím propláchne kyselinou a zneutralizuje. Používá se v koncentraci 0,5-1,0%.

Látky používané pro zpevnění média (2)

Pro přípravu tuhých médií se používá agar. Velmi důležitá je čistota používaného agaru, jelikož obsahuje vápník, hořčík, draslík a sodík, a tak změna koncentrace agaru v médiu může změnit i koncentraci některých prvků v živném médiu.

Vedle agaru je možné používat ke zpevnění média také agarózu, Phytigel a Gerlite, které představují syntetické látky.

V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě, perforovaném celofánu atd.

Růstové regulátory

Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová. Mezi další růstové regulátory patří ethylen, brassinosteroidy, kyselina jasmonová, polyamidy, oligosacharidy a některé typy fenolických látek (2).

O charakteru růstu explantátové kultury nerozhoduje pouze jenom koncentrace jednotlivých hormonů, ale často jejich vzájemný poměr (2).

Mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftyloctová (NAA). IAA představuje nativní auxin, ostatní jsou látky syntetické. Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolizovány. Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtů (2).

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

Další skupinou růstových regulátorů, které se do kultivačních médií dodávají, jsou gibereliny a kyselina abscisová. Většina explantátů jejich přítomnost pro svůj růst nevyžaduje, ale u některých druhů mohou stimulovat jejich růst (2).

Ethylen je jediný dosud známý plynný hormon, což jej výrazně odlišuje od ostatních fytohormonů. Jeho koncentrace v buňce je velmi nízká, daná rozpustností v cytoplazmě. Většina ethylenu difunduje do mezibuněčných prostorů a dále průduchy do atmosféry. Ale v cytoplazmě byla nalezena specifická vazebná místa pro ethylen a předpokládá se, že biologický účinek je zprostředkován vazbou na tyto bílkoviny. Ethylen uvolněný do atmosféry může ovlivnit i rostliny ve svém nejbližším okolí. Mezi hlavní fyziologické účinky ethylenu patří inhibice prodlužovacího růstu a stimulace růstu radiálního, stimulace apikální dominance a dále urychlení zrání plodů a podobným způsobem stimuluje stárnutí a opad listů květů a plodů (1).

Ve všech případech je třeba při zhotovení živného média věnovat pozornost koncentraci vodíkových iontů. Obvykle se doporučuje pH 5,5-6,0 v některých případech 6,0-7,0. Příslušná hodnota pH se v případě potřeby upraví hydroxidem draselným nebo kyselinou chlorovodíkovou (2).

Chemické složení a fyzikální vlastnosti média musí odpovídat požadavkům rostliny v různých fázích rozmnožovacího cyklu. V první etapě (založení kultury) se do média přidávají někdy antioxidanty. Ve druhé etapě se médium často obohacuje o látky, které stimulují tkáňovou proliferaci. Jedná se především o vyšší koncentrace cytokininů. Ve třetí etapě množení se do média přidávají především auxiny, podporující elongační fázi růstu a zakládání kořenů (2).

3.1.4. Využití explantátových kultur (4)

Získ produktů obsažených v obtížně pěstovatelných rostlinách.

- Alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře. Je možné vedení procesu za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. Výsledné produkty jsou homogenní, bez kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur.
- Získ nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk.
- Produkty biotransformací, kdy z ekonomicky dostupnějších substrátů lze získat farmaceuticky významné látky.

3.1.5. Množení nepřímou organogenezí (2)

Jedna z možností produkce rostlin je množení nepřímou organogenezí. Tato metoda je charakteristická vznikem kořenů stonků, popř. celých rostlin z neorganizovaného kalusového pletiva. Protože tyto orgány nevznikají z původního pletiva mateřské rostliny, označuje se tato organogeneze jako nepřímá. Množení probíhá v několika etapách:

- Odvození kalusu

Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk. U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd. U jednoděložných je výběr pletiv vhodných k odvození kalusu menší. Ještě problematičtější je odvození kalusu u dřevin.

Růst kalusu je ve většině případů indukován umístěním explantátu na médium s relativně vysokou koncentrací auxinu (1-10 mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. Kalus může být použit k odvození suspenzní kultury v tekutém médiu jeho umístěním na třepačku.

Hlavní výhodou suspenzních kultur je velmi rychlý růst buněk, což je způsobeno jejich lepším kontaktem s živným médiem. Z hlediska mikropropagace rostlin je nevýhodné, že kalusová kultura s opakovanými pasážemi ztrácí morfogenní schopnost a stoupá u ní pravděpodobnost genetických změn.

- Organogeneze v kalusové kultuře

Vytvořený kalus resp. buňky suspenzní kultury jsou přeneseny na médium s nižší koncentrací auxinu a dochází k vytvoření orgánových základů.

3.1.6. Mikropropagace rostlin (4)

Mikropropagace představuje způsob vegetativního množení rostlin s využitím explantátových kultur. Ve srovnání s tradičními způsoby vegetativního rozmnožování má spoustu výhod:

- kultura je odvozena z malých částí rostlin a není vyžadován velký prostor
- rozmnožování se provádí za sterilních podmínek, čímž se zabrání virovým a mikrobiálním nákazám
- podmínky množení jsou přesně definovány
- je možná produkce druhů nebo rostlinných klonů, které se množí velmi pomalu nebo se nemnoží vůbec
- bez závislosti na ročním období je možno rostliny množit během celého roku

Nevýhodami jsou velké finanční náklady na laboratorní vybavení a nemožnost využití mechanizace.

Fáze mikropropgace (2)

Vývoj rostlin v podmínkách *in vitro* je možné rozdělit do 4 základních stádií nebo fází.

V prvním stádiu jde o odvození sterilní kultury – **primokultury**, které spočívá v odebrání vhodného explantátu a jeho sterilizaci a kultivaci v živném médiu. Materiál odvozený v primokultuře je potom využíván ve druhém stádiu, které se označuje jako stádium **multiplikační** či **proliferační**. Cílem druhého stádia je dosáhnout vysokého koeficientu množení a získat co největší počet nových rostlin. Toto stádium může být opakováno pasážováním na téže proliferační médium nebo může následovat třetí stádium, které je většinou spojeno se **zakořeňováním**. Poslední, čtvrté stádium představuje stádium **převodu** rostlin z kultury *in vitro* **do podmínek *in vivo*** a je spojeno někdy se zakořeňováním.

Tato stádia jsou charakteristická určitým vývojem kultury *in vitro*, který je ovlivněn změnou kultivačních podmínek v těchto jednotlivých stádiích. K těmto základním stádiím je někdy zařazováno stádium 0, které představuje fázi, kdy je určitým způsobem připravován matečný materiál (rostlina) k odběru explantátu.

3.1.7 Buněčné suspenzní kultury (2)

Buněčné suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Použitím tekutých živných médií je umožněno buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem, což zajistí rychlý přístup k jednotlivým složkám média. Snadný přístup živin a dobrá výměna dýchacích plynů v pohybujícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze.

Ideální buněčná suspenze je morfologicky a biochemicky homogenní. Při dlouhodobé kultivaci se však buněčná suspenze stává značně heterogenní. Heterogenita je způsobena genetickými změnami, které jsou v suspenzních kulturách poměrně časté.

Metody kultivace buněčných suspenzí

Pro získání suspenzní kultury je většinou nezbytné nejprve odvodit kalusové pletivo. Kousky kalusu jsou potom kultivovány na tekutém médiu na třepačce nebo rolleru. K získání jednobuněčné suspenze se musí rotací suspenzní kultura pravidelně filtrovat přes sítko o známé velikosti pórů.

Ke kultivaci buněčných suspenzí se používají různé kultivační systémy. Pro všechny je společné používání tekutých živných médií, která se pohybují. Pohybem média se dosahuje jeho provzdušnění, zajišťuje se lepší přístup živin k jednotlivým buňkám a napomáhá se rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. Při kultivaci na rolleru nebo třepačce se kultivační nádoby naplňují médiem pouze z jedné pětiny až jedné čtvrtiny.

Růst a pasážování suspenzních kultur

Růst buněčné suspenze v uzavřeném systému lze charakterizovat tzv. **růstovou křivkou**. Průběh křivky je charakteristický pomalým růstem buněčné suspenze těsně po naočkování (lag fáze), velmi intenzivním nárůstem v exponenciální fázi a poklesem popř. úplným zastavením růstu ve stacionární fázi. Růst buněk ve stacionární fázi je především limitován nedostatkem živin, které byly vyčerpány z média v průběhu exponenciálního růstu.

3.2 Stres rostlin a fyziologie stresu

Fyziologie stresu (15)

Každá rostlina musí během svého života čelit vlivům okolního prostředí jako jsou teplotní výkyvy, minerální deficiencie, nedostatek světelného záření, poškození, infekce a mnohé další, které lze souhrnně označit jako environmentální stres. Rostliny si proto vyvinuly celou řadu adaptačních a aklimatizačních mechanismů, které jim umožňují aktivně reagovat na danou situaci. Někdy ale míra stresového faktoru převyšuje přizpůsobivost rostliny a dochází k fyziologické nerovnováze, jejímž typickým důsledkem je nadprodukce reaktivních kyslíkových derivátů (H_2O_2 , O_2 , HO_2). Tyto vysoce reaktivní molekuly

jsou schopny oxidovat nukleové kyseliny, enzymy, receptory i membránové lipidy, a proto musí být rostlinou buňkou aktivně eliminovány.

Stres-vymezení pojmu (9)

- Stres je stav fyziologické zátěže organismu vyvolaný jedním nebo několika mimořádně nepříznivými vnějšími vlivy (nebo podmínkami), tzv. stresovými faktory neboli stresory.
- Může, ale nemusí znamenat ohrožení života rostliny.

Stres jako vychýlení z homeostáze (9)

Homeostáze je stav relativní stálosti vnitřního prostředí organismu, zajišťovaný rovnováhou vnitřních regulačních procesů. U rostlin je méně výrazná než u živočichů, což souvisí s takovými jejich vlastnostmi, jako jsou částečná nebo úplná poikilothermie a omezenost selektivity absorpčních procesů v kořenech. Přesto jsou i u rostlin některé parametry vnitřních faktorů poměrně stálé nebo se mění jen v úzce vymezených mezích, často navzdory velkým výkyvům těchto faktorů vně organismu (jako např. koncentrace vápníku a pH v cytoplasmě).

Variační rozpětí mnoha jiných parametrů je velké, avšak zůstává v rámci homeostázy. Při překročení tohoto rámce vzniká stres.

Je-li organismus svému prostředí optimálně přizpůsoben, žádný stres teoreticky nevzniká. K takovému stavu se však rostliny během evoluce jen více nebo méně přibližují.

Stres vzniká, když se prostředí změní tak, že rostlina k němu již není geneticky přizpůsobena. Na přirozených stanovištích k tomu dochází především v závislosti na čase, tzn. v určitých obdobích roku, nebo tehdy, když zesílí konkurenční tlak jiných rostlin.

3.3 Stresové faktory (9)

Stresové faktory se dělí na abiotické a biotické. Abiotické stresové faktory můžeme rozdělit ještě na chemické a fyzikální.

a) chemické

- nedostatek vody
- nedostatek minerálních živin
- vysoká koncentrace solí v půdě
- nedostatek kyslíku v půdě
- přílišná kyselost půdy
- xenobiotika

b) fyzikální

- vysoká a nízká teplota
- vysoká a nízká ozáření

c) biotické

- patogenní mikroorganismy
- alelopatie
- působení býložravých živočichů (spásání, poranění)

3.4 Reakce rostlin na stresové faktory

Na rozdíl od živočichů nemají vyšší rostliny možnost před stresovými faktory aktivně unikat. Proto se u nich vyvinuly specifické způsoby rezistence (odolnosti) proti stresovým faktorům a proti stresu (9).

Těmito způsoby jsou (9):

- Tolerance – rostlina působení stresového faktoru snáší aniž by utrpěla větší poškození
- Ochrana – před stresovými faktory
- Odstranění – nebo zmírnění následků stresu

Vytváření rezistence proti stresovým faktorům je obvykle spojeno se zvýšenou spotřebou energie na úkor životních funkcí, např. růstu a produkce potomstva. Na druhé straně může být mírný stres užitečný v tom smyslu, že otužuje (zvyšuje odolnost) proti extrémním zátěžím (9).

Průběh a výsledek stresové reakce závisí na mnoha činitelích, které se týkají jak stresoru, tak reagující rostliny. U stresoru je nutné brát v úvahu především charakter stresoru, jeho velikost (odchylku od optimálního stavu), rychlost jeho nástupu a dobu působení. U rostliny je rozhodující její genotyp, vývojové stádium a fyziologický stav. V přirozených podmínkách obvykle působí více stresorů současně a jejich efekt se obvykle vzájemně prohlubuje. Působení různých stresorů na rostlinu se na úrovni buněk a pletiv může projevit stejně, např. vysoká teplota, mráz i vysoký obsah solí v půdním roztoku mohou vyvolat vodní deficit, stav, který se obvykle nazývá vodní stres. Naopak, otužení k působení jednoho stresoru může přinést zvýšení odolnosti ke stresoru jinému (3).

Stres má u rostlin značnou šíři projevů. Jako základní charakteristika se obvykle uvádí přechodné nebo trvalé zastavení růstu, nemusí však platit vždy a pro všechny typy stresorů. U některých rostlin při působení určitých stresorů může být zvýšená růstová aktivita součástí obranných reakcí. Zastavení růstu je však obvyklým důsledkem metabolických změn, které mají zajistit přežití rostliny, energie je využívána k obranným reakcím (3).

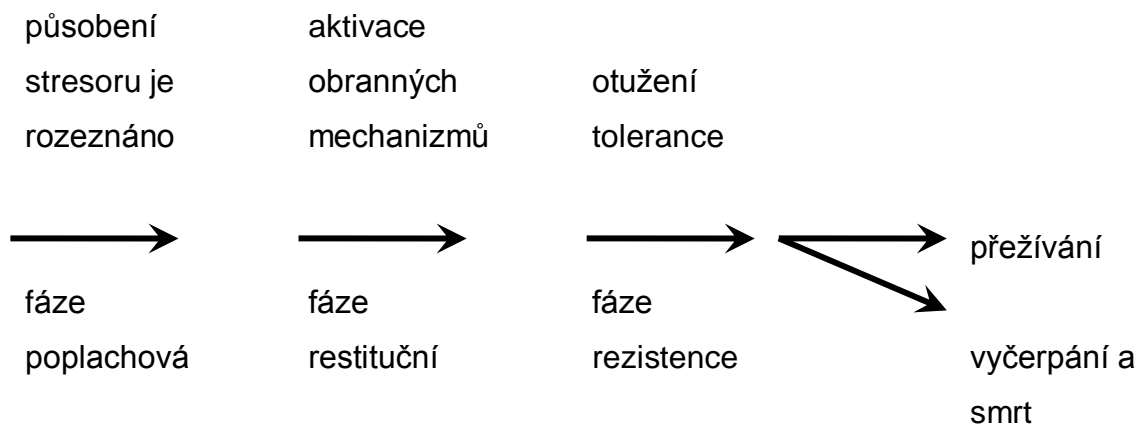


Schéma průběhu stresové reakce (3)

Stres se nepříznivě projeví na hospodářském výnosu rostlin, a proto je předmětem značného zájmu (3).

3.5 Mechanismy stresových reakcí (1)

Metabolické změny v buňkách při působení i velmi odlišných stresorů mají skutečně řadu společných znaků. K nejčastějším společným změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresovým faktorům, současně patří:

- Tvorba stresových proteinů
- Tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku
- Tvorba stresových fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylenu, kyseliny jasmonové, methyljasmonátu a polyamidů)
- Tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek)

Tvorba stresových proteinů

Pod vlivem kteréhokoliv ze stresových faktorů dochází často již během několika desítek minut k velmi dramatickým změnám v kvantitativním i kvalitativním zastoupení proteinů v buňkách. Tvorba některých prudce stoupá, u jiných se naopak zastavuje. V hojné míře se však také syntetizují proteiny, které za normálních okolností vůbec nedají v buňkách zjistit. Změny v syntéze proteinů obvykle kulminují několik hodin po začátku působení stresoru. Poté dochází k pomalému návratu do původního stavu. Z několika desítek proteinů, jejichž syntéza se působením určitého proteinu prudce zvyšuje, jen jistá část se pravidelně vyskytuje i u jiných typů stresů. Indukce zbývajících částí stresových proteinů je specificky vázána na určitý stresový faktor.

Nově tvořené stresové proteiny mají velmi rozmanitou velikost i funkci. Je velmi snadné rozdělit je pomocí běžných detekčních metod (např. dvojrozměrné gelové elektroforézy) do skupin podle molekulové hmotnosti, která bývá nejčastěji v rozmezí od 8000 do 260000. Mnohem obtížnější je určit jejich funkci. Většina z těchto proteinů, jejichž tvorba je indukována nespecificky, tedy různými typy stresorů, patří do některé z těchto tří funkčních skupin:

- Molekulární chaperony
- Proteázy
- Ubikvitin

Chaperony slouží nejen k řízení změn konformace proteinů při transpotech přes membrány, ale jsou schopny upravit jejich konformaci i při mírném poškození. Pokud ovšem dojde k velkým, nenapravitelným změnám, je takový protein "označen" malou molekulou ubikvitinu a rozložen pomocí proteáz na aminokyseliny. Ty jsou pak využity k syntéze nových proteinů. Funkce mnoha dalších proteinů, jejichž syntéza je indukovaná jen některými stresovými faktory, není ještě dosud dostatečně prozkoumána.

Aktivní formy kyslíku

Běžný molekulární kyslík v naší atmosféře je poměrně málo reaktivní, ovšem některými procesy v rostlinách může být přeměněn na mnohem aktivní

formy (singletový kyslík a superoxidový anion, O_2^-) či silně oxidační sloučeniny (hydroxylový radikál, peroxid vodíku).

Úloha aktivních forem kyslíku ve stresovaných rostlinách je značně rozmanitá a do jisté míry rozporná. Jednak vznikají jako nebezpečné produkty a rostliny musí mít účinné systémy na jejich deaktivaci, jednak mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů, a tudíž je nutné udržovat jejich koncentraci na jisté úrovni.

3.6 Produkce sekundárních metabolitů

Rostliny mají schopnost z živin syntetizovat kromě nepostradatelných složek svého těla (aminokyselin, vitamínů, nukleových bází) i mnohé další, jejichž funkce není zřejmá, a které jsou pravděpodobně pro vlastní růst rostliny postradatelné. Označují se jako sekundární metabolity (2).

Sekundární metabolity jsou definovány jako organické látky. Jednotlivé sekundární metabolity se v rostlinné říši nevyskytují obecně, určitou látku často syntetizuje jen jeden druh nebo několik druhů rostlin, většinou taxonomicky příbuzných. Jedna rostlina však může tvořit až sta různých látek charakteru sekundárních metabolitů (3).

Funkce sekundárních metabolitů jsou velmi různé. Některé z nich dodávají rostlině pevnost (lignin, kutin), jiné ji ochraňují před dopadajícím zářením, patogeny nebo škůdci, další se podílejí na příjmu a přenosu signálů mezi rostlinou a prostředím i uvnitř rostliny (3).

Tkáňové kultury rostlin se mohou v průmyslové produkci sekundárních metabolitů uplatnit na několika úrovních. Předně je možné využít tkáňových kultur k vlastnímu množení rostlin významných z hlediska produkce sekundárních metabolitů. Tkáňové kultury mají oproti tradičním způsobům získávání sekundárních metabolitů podstatné výhody (2):

- Syntéza probíhá řízeně, nezávisle na klimatu a půdních podmínkách
- Jsou vyloučeny negativní biologické vlivy, které v přírodě mění produkci sekundárních metabolitů

- V tkáňové kultuře je možné selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů
- Automatizací řízení buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce

Elicitace (2)

Stimulačně na produkci sekundárních metabolitů může působit vliv určitého stresu – např. snížení koncentrace živin v živném roztoku, vynechání růstového regulátoru nebo aplikace prekursorů či tzv. elicitorů do média. Elicitory působí jako stresový faktor vyvolávající obrannou odpověď buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů.

Elicitory můžeme rozdělit na biotické (bakterie, viry, houby, kvasinky) a abiotické (změny pH, UV záření, chemikálie, změny osmotického tlaku).

Biotická elicitace – tvorba fytoalexinů (21)

Fytoalexiny jsou antimikrobiální látky, které se tvoří jen když se hostitelská rostlina dostane do přímého kontaktu s parazitem (biotický elicitor). Jsou nespecifické pro mikroorganismy, i když mohou být pro různé druhy patogenů různě účinné. Nejjednodušším fytoalexinem je kyselina benzoová. Většinou však mají složitější strukturu, ať již polyacetylenovou, terpenickou nebo dokonce idolovou.

V současnosti je známo asi 200 struktur, z nichž polovina byla nalezena u bobovitých rostlin. V příslušné rostlině se patrně po infekci tvoří více látek, jejichž koncentrační poměr závisí na daných podmínkách a rostlinném druhu.

Abiotická elicitace

Jednou z možností abiotické elicitace je elicitace elektrickým proudem.

Elektrický proud má spoustu výhod na rozdíl od jiných abiotických a biotických elicitorů. Na rozdíl od mnohých biotických elicitorů, na které reagují jen některé rostliny, elicitace elektrickým proudem zvyšuje biosyntézu sekundárních metabolitů u mnoha rostlinných druhů a v mnoha rostlinných

tkáních (kořeny, buněčné suspenze). Různé koncentrace mnohých elicitorů jsou toxické pro rostlinnou buňku, což může zapříčinit její zánik (6).

Mechanismus působení elektického proudu na biochemické mechanismy v rostlinné buňce a následující aktivace biosyntetických drah zůstává zatím neobjasněn. Jednou z možností působení je změna propustnosti membrány (6).

Na obou stranách buněčné membrány se nacházejí volné ionty nebo nabitě proteiny, které mají důležitou roli v různých metabolických cestách v buňce. Vnější elektrické pole jednoduše reaguje na nabitě částice(látku) a změní jejich distribuci. Takový jev změní dielektrické vlastnosti membrány nebo naruší elektrochemickou bilanci a následně celou funkci buňky (13).

Další z mechanismů, které zvyšují produkci sekundárních metabolitů je produkce reaktivních forem kyslíku. Tyhle formy kyslíku mohou být jako první signály po elicitaci, poté následují jiné odezvy jako produkce sekundárních metabolitů (13).

Scopa a kol. (17) použil jako abiotický elicitor elektrický proud o hodnotě 10 mA, kde v důsledku elicitace došlo k zvýšení rychlosti růstu výhonků a kořenů u *Arundo donax*.

Kaimoyo a kol. (6) použil ve své práci různé hodnoty elektrického proudu a napětí. Po elicitaci suspenzní kultury *Trifolium pratense*, *Cicer arietinum*, *Pisum sativum*, *Trigonella foenum-graecum* vždy došlo k nárůstu jednotlivých obsahových látek.

3.7 *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Charakteristika:

Tento fialově kvetoucí bodlák ze středomořské oblasti patří mezi léčivky známé již ve středověku. Aktivní složky se vyskytují hlavně v semenech a jsou flavonoidní povahy (22).

Ve směsi, která se označuje jako silymarin, převažují (+)-silybin, (+)-silydianin, (+)-silychristin, (+)-isosilybin vedle nespecifického kvercetinu a taxifolinu. Typické flavonoidy ostropestřce mají k flavanonové části připojenu molekulu koniferylalkoholu, který je prekurzorem ligninu, proto se též označují jako flavanolignany (22).

Droga:

Cardui mariae fructus – je to chmýru zbavený zralý plod.

Český lékopis udává nejméně 1,5 % silymarinu, vyjádřeného jako silybinin ($C_{25}H_{22}O_{10}$; M_r 482,4), počítáno na vysušenou drogu (12).

Obsah silymarinu zahrnuje (12):

- Součet obsahů silychristinu a silydianinu 20 % až 45 %, vztaženo k celkovému obsahu silymarinu
- Součet obsahů silybininu A a silybininu B: 40 % až 65 %, vztaženo k celkovému obsahu silymarinu
- Součet obsahů isosilybininu A a isosilybininu B: 10 % až 20 %, vztaženo k celkovému obsahu silymarinu

Terapeutické údaje (8):

Jako podpůrná léčba chronických zánětlivých jaterních onemocnění, jaterní cirhozy a toxického poškození jater.

Farmakoterapeutická skupina (8):

fytofarmakum – hepatikum, hepatoprotektivum

Účinné látky působí antagonisticky vůči mnohým modelům jaterního poškození: toxinům houby *Amanita phalloides* (muchomůrky zelené), faloidinu a alfa-amanitinu, lanthanoidům, tetrachloridu uhličitému, galaktosaminu, thiocetamidu a hepatotoxickému viru FV3 studenokrevných zvířat.

Léčebný účinek je založen na třech mechanismech účinku (8):

- Obsahové látky zpevňují strukturu buněčné membrány hepatocytu, takže hepatotoxická látka nemůže proniknout do buňky.
- Obsahové látky stimulují aktivitu nukleární polymerázy I v jádru, a tím následně zvýšenou syntézu ribozomálních bílkovin. Tím se zvyšuje schopnost regenerace jater a stimuluje neogenezi hepatocytů.
- Silymarinový komplex má antiperoxidativní aktivitu, vychytává volné radikály, a tím narušuje patofyziologický proces peroxidace lipidů, který je odpovědný za rozpad buněčných membrán.

V experimentálních pracích jsou uvedeny protinádorové účinky *Silybum marianum* např. u nádorů prostaty, děložního čípku, prsu, tlustého střeva, slinivky břišní, plic, kůže a mozku. Existují i klinické studie, které uvádí prokazatelné zpomalení nádorového růstu u nemocných s rakovinou prostaty a u akutní lymfoblastové leukémie. U nemocných s nádorovým onemocněním se ostropestřec podává pro jeho ochranné účinky před toxickými účinky chemoterapie. Kromě již zmíněných hepatoprotektivních a vlastností chrání i před kardiotoxickými a nefrotoxickými účinky chemoterapie (23).

Ukazuje se, že ostropestřec by mohl mít také ochranné účinky před systémovými zánětlivými nemocemi, dokonce bývá používán jako pomocná léčba i u nemocných infikovaných virem HIV. Pravděpodobně by mohl ostropestřec být užitečný i v léčbě tzv. idiopatických střevních zánětů (23).

Ostropestřec mariánský zřejmě také působí ochranně i proti diabetu. V těchto studiích byl podáván silybinin-b-cyklodextrin a jeho užívání opravdu snižovalo hladinu krevní glukózy u nemocných s diabetem 2. typu. *Silybum marianum* má i ochranné účinky na pokožku, chrání před nebezpečným ultrafialovým zářením v důsledku svých antioxidačních vlastností (23).

Uvažuje se dokonce i o využití ostropestřce v prevenci nebo oddálení příznaků neurologických nemocí, jako jsou např. roztroušená skleróza, Parkinsonova nemoc či Alzheimerova nemoc (23).

Kontraindikace, nežádoucí účinky a interakce:

Nejsou popisovány

Obvyklá dávka (16):

V těžkých případech podáváme 420 mg/den, v lehčích a jako udržovací dávku 210 mg ve třech dávkách za den.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Biologický materiál

V diplomové práci jsem použila suspenzní kulturu *Silybum marianum* (L.) Gaertn., v pasáži 51-58.

4.2. Pomocné látky a chemikálie

- Destilovaná voda R
- Ethanol 96%
- Methanol R
- Ajatin

4.3. Přístroje a vybavení

- Analytické váhy Sartorius PRLT A 1
- Autokláv P S 20 A Chirana
- Autosampler Jasco AS-2055
- Box s laminárním prouděním Fatran LF
- Diodový detektor Jasco MD-2015
- Horkovzdušný sterilizátor, Chirana SVS9/1
- Kolona Li Chrospher RP-18 125-4, sorbent Li Chrospher 5
- Mikrofiltry (0,45), Tessek
- Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5
- Pumpa Jasco PU-2089
- Sušárna HS 61A Chirana
- Termostat kolony Jetstream 2 Plus
- Těsnění na vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc
- Třepačka UNIMAX 2010, Heidolph Instruments
- Vialky LABICOM s.r.o. Olomouc
- Vodní lázeň, typ 1042, GFL
- Ultrazvuk Bandelin Sonorex RK 100H

4.4. Příprava a složení živného média (7)

CaCl ₂ .H ₂ O	440,000
KNO ₃	1900,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
NH ₄ NO ₃	1650,000
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,000
FeSO ₄	27,840
Na ₂ EDTA	37,310
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,500
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0,830
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Inozitol	100,000
Hydrolyzát kaseinu	1000,000
Glycin	2,000
Kyselina nikotinová	0,500
Pyridoxin	0,500
Thiamin	0,100
Sacharóza	30000,000

Veškeré složky živného média byly odváženy na analytických vahách a rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000,0 ml a doplněné destilovanou vodou po rysku. Kyselina α -naftyloctová (NAA) byla použita jako růstový stimulant v koncentraci 1 mg/l živného média.

4.5. Kultivace kultur

Ke kultivaci byly použity vysterilizované Erlenmayerovy baňky o objemu 100ml. Do každé baňky bylo dáno 30 ml připraveného živného média s růstovým regulátorem. Před pasážováním tkáňových kultur byla hrdla baňky uzavřena hliníkovou fólií a dána na sterilizaci po dobu 15 minut při 121 °C a 100kPa.

Box s laminárním prouděním byl nejprve vymyt roztokem 96% ethanolu a poté vysvícen germicidní lampou. Před pasážováním byl každý hliníkový kryt baňky vydesinfikován též roztokem 96% ethanolu. Následovalo vlastní pasážování, kdy malé množství kalusu z předešlé kultivace bylo přeneseno na můstek z filtračního papíru, který byl částečně ponořen do kultivačního média.

Vlastní kultivace probíhala přibližně 3 týdny při teplotě 25 °C a osvětlení s 16-ti hodinovou světelnou periodou.

Narostlé kalusy byly použity k přípravě suspenzní kultury. Kalus byl mechanicky rozmělněn a převeden do Erlenmayerovy baňky s 30 ml média se stejným růstovým regulátorem. Kultivace probíhala po dobu přibližně 10 dnů na třepačce (120 ot/min) při teplotě 25°C a osvětlení, jako při kultivaci kalusové kultury.

4.6. Elicitace elektrickým proudem

Suspenzní kultury byly vystaveny elektrickému proudu o intenzitě 50 mA s rozdílnou hodnotou napětí (5, 7, 8, 10, 15, 20, 24 V) po dobu 10, 30 a 60 minut. Po elicitaci byly umístěny na třepačku (120 ot/min) při teplotě 25°C a osvětlení s 16-ti hodinovou světelnou periodou. Odběr suspenzních buněk byl proveden vždy po 6 a 24 hodinách od konce elicitace a následovala filtrace přes filtrační papír.

Médium odebrané po oddělení suspenzních buněk bylo odpařeno na vodní lázni a odparek byl rozpuštěn v 10 ml methanolu R. Buňky suspenzní kultury, které zůstaly na filtračním papíře byly usušeny, upráškovány, poté následovala úprava pro HPLC analýzu.

4.7. Stanovení obsahu flavolignanů - HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analýza

Princip stanovení (14):

Jde o separační metodu, která umožňuje současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, a to s vysokou selektivitou, citlivostí a v relativně krátkém časovém intervalu.

Pro analýzu postačuje velmi malé množství vzorku a pro velké série vzorků je možno s využitím automatického dávkovače celou metodu plně automatizovat. Z HPLC záznamu získáme detailní informace o identitě, obsahu i čistotě analyzovaného vzorku.

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas, což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Kvantitativní charakteristikou je plocha (výška) chromatografického píku, která je přímo úměrná koncentraci stanovované látky.

Parametry HPLC analýzy:

Analýza byla provedena na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), jehož součástí je předkolonový filtr LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m).

Detekce byla prováděna pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190-450 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 288 nm.

Kolona (12):

rozměry: délka = 0,125 m,
vnitřní průměr = 4 mm

- Stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μ m).
- Mobilní fáze: mobilní fáze A: směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, methanolu R a vody R (0,5+35+65)

- Mobilní fáze B: směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, methanolu R a vody R (0,5+50+50)
- Průtoková rychlost: 0,8 ml/min
- Detekce: spektrofotometrický detektor, 288 nm.

Nástřik: 10 μ l

Porovnávací roztok: Množství *ostropestřecového extraktu suchého standardizovaného CRL* odpovídající 5,0 mg silybininu (m₁g) se rozpustí v *methanolu R*

Test způsobilosti:

- rozlišení: nejméně 1,8 mezi píkem silybininu A a píkem silybininu B
- získaný chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému s ostropestřcovým extraktem suchým standardizovaným CRL.

K určení píků silychristinu, silydianinu, silybinu A, silybinu B, isosilybinu A a isosilybinu B se použije chromatogram dodávaný s ostropestřcovým extraktem suchým standardizovaným CRL. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se pík silydianinu může lišit velikostí, může chybět nebo může být přítomen jako hlavní pík. Určí se plocha píků silychristinu, silydianinu, silybininu A, silybininu B, isosilybininu A a isosilybininu B. (12)

Příprava pro HPLC analýzu

Usušené vzorky kalusů a buněk suspenzní kultury byly rozdrobněny v třence, poté extrahovány 10 ml methanolu R 80% po dobu 10 min pod zpětným chladičem na vodní lázni. Extrakce byla opakována dvakrát.

Extrakty byly spojeny a doplněny na 20 ml, následovala filtrace 1,7 ml roztoku přes mikrofiltr do vialek.

Také vzorky média byly vysušeny a rozpuštěny v 10 ml methanolu R 80% a filtrovány přes mikrofiltr do vialek.

Takto upravené vzorky byly analyzovány metodou HPLC.

Kalibrační křivky flavonolignanů:**1. Kalibrační křivka: taxifolin**

x: koncentrace (mg/g)

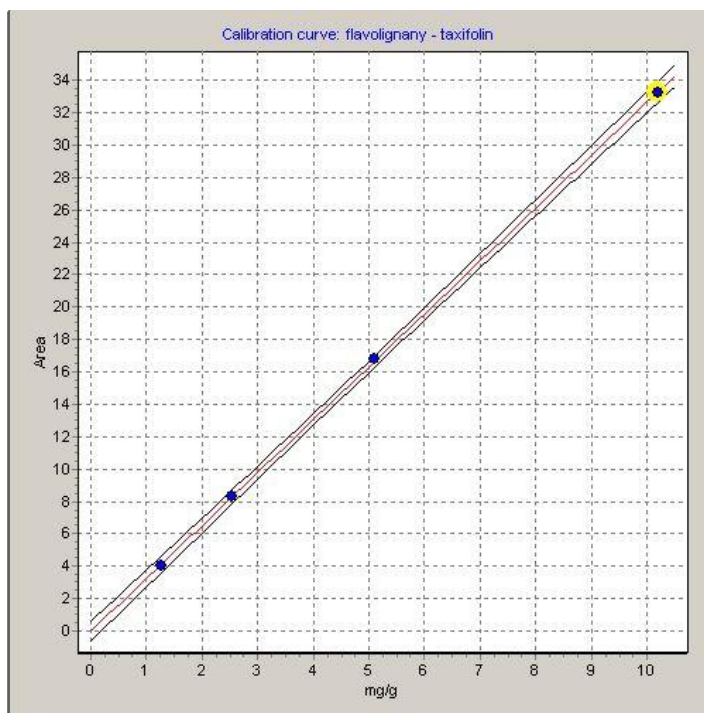
y: plocha

 $y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26361

**2. Kalibrační křivka: silychristin**

x = koncentrace (mg/g)

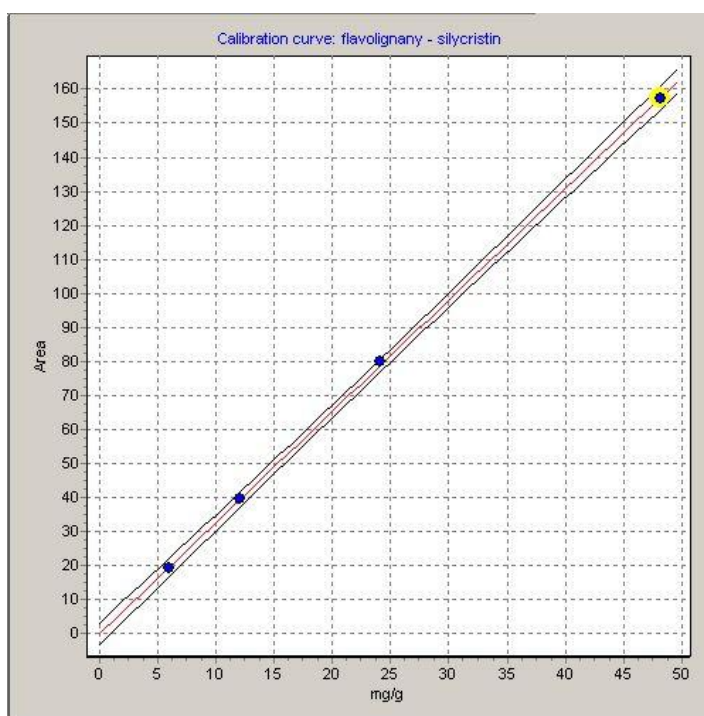
y = plocha

 $y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26964



3. Kalibrační křivka: silydianin

x = koncentrace (mg/g)

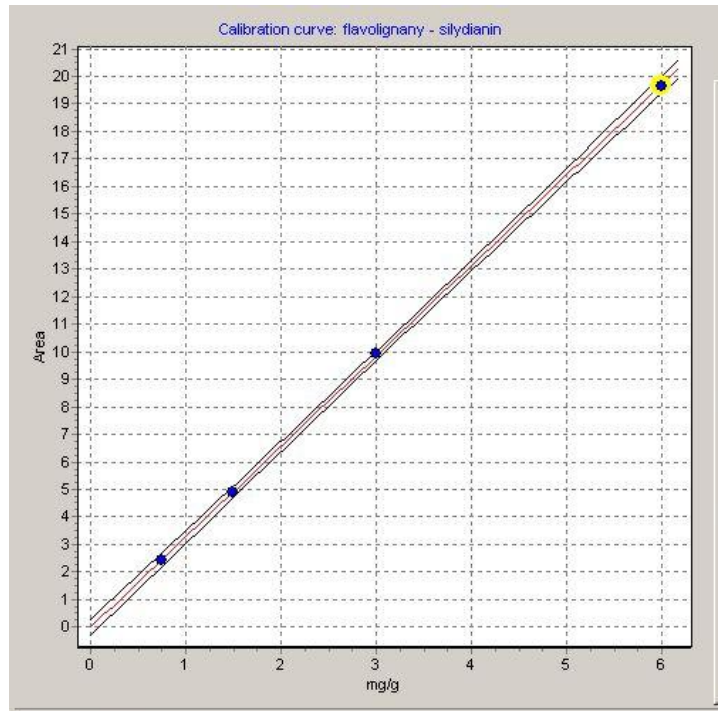
y = plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,28186



4. Kalibrační křivka: silybin A

x = koncentrace (mg/g)

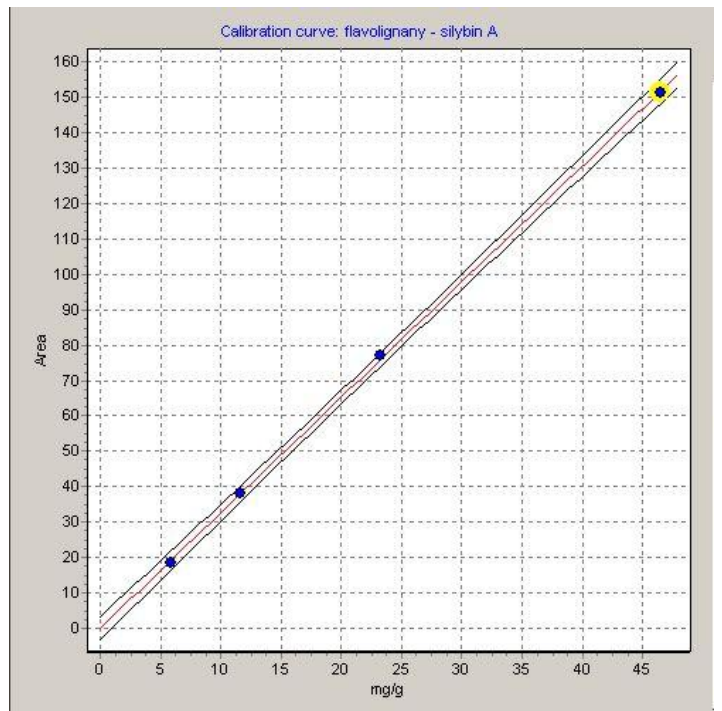
y = plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26609



5. Kalibrační křivka: silybin B

x = koncentrace (mg/g)

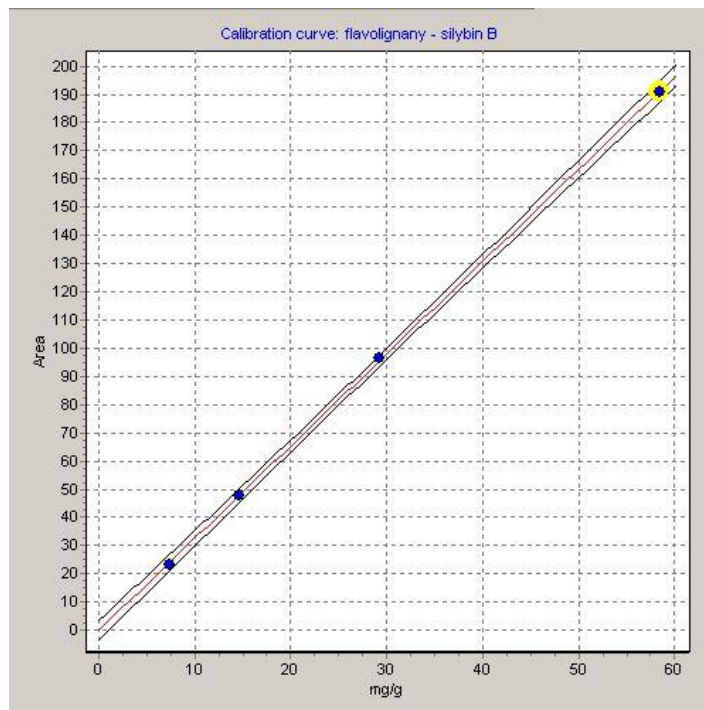
y = plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26957



6. Kalibrační křivka: isosilybin A

x = koncentrace (mg/g)

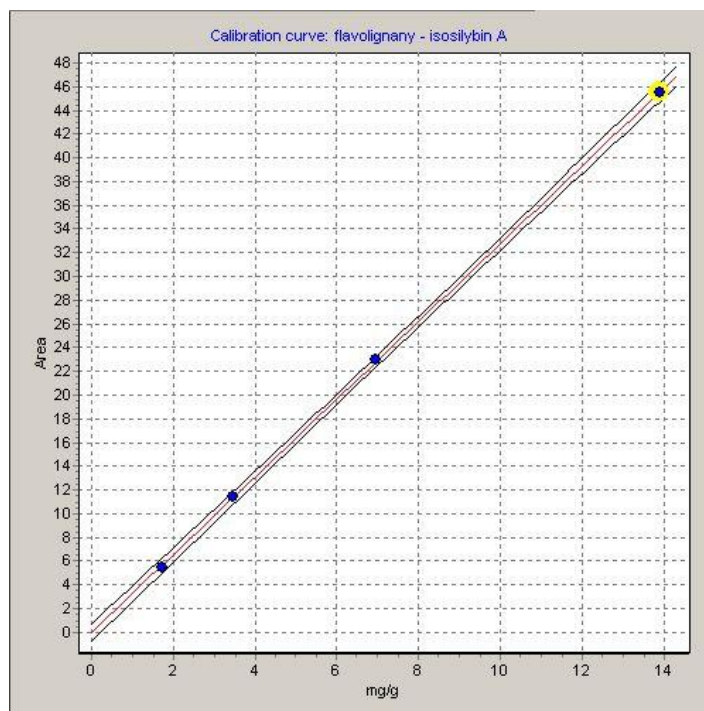
y = plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,27665



7. Kalibrační křivka: isosilybin B

x = koncentrace (mg/g)

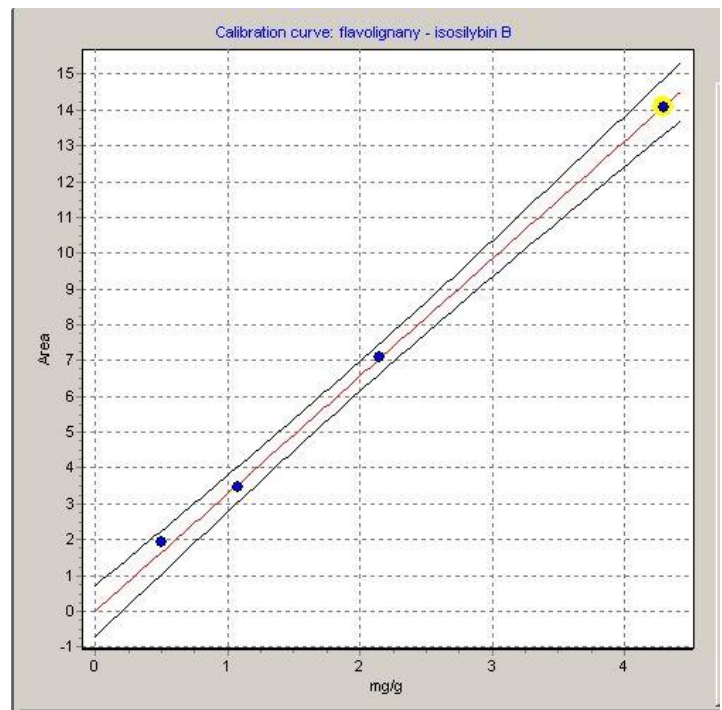
y = plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,28158



4.8. Statistické zpracování výsledků

Funkce směrodatné odchylky je dána vztahem (10):

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

s – směrodatná odchylka

x – hodnota sledované veličiny

\bar{x} – průměrná hodnota sledované veličiny

n – počet členů souboru

Statistická významnost vlivu elicitoru na obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu byla zjištěna pomocí t-testu rozdílů dvou průměrů.

Pro testovací kritérium platí vztah:

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

t – testovací kritérium

x_1 – aritmetický průměr kontrolního souboru

x_2 – aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 – směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 – směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 – počet členů kontrolního souboru

n_2 – počet členů pokusného souboru

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

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou kritickou hodnotou $t(v)p$ pro vypočtený stupeň volnosti v a zvolenou hladinu významnosti p . Je-li hodnota t větší než hodnota $t(v)p$, je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti p (10).

Byla provedena 3 paralelní stanovení pro stanovení obsahu jednotlivých složek silymarinového komplexu, z toho vyplývá, že počet členů souboru je $n_1 = n_2 = 3$ a počet stupňů volnosti $v = 4$. Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a pro 4 stupně volnosti je tato kritická hodnota testovacího kritéria $t(v)p$ rovna 2,78. Výsledky jsou statisticky významné, je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota (10, 11).

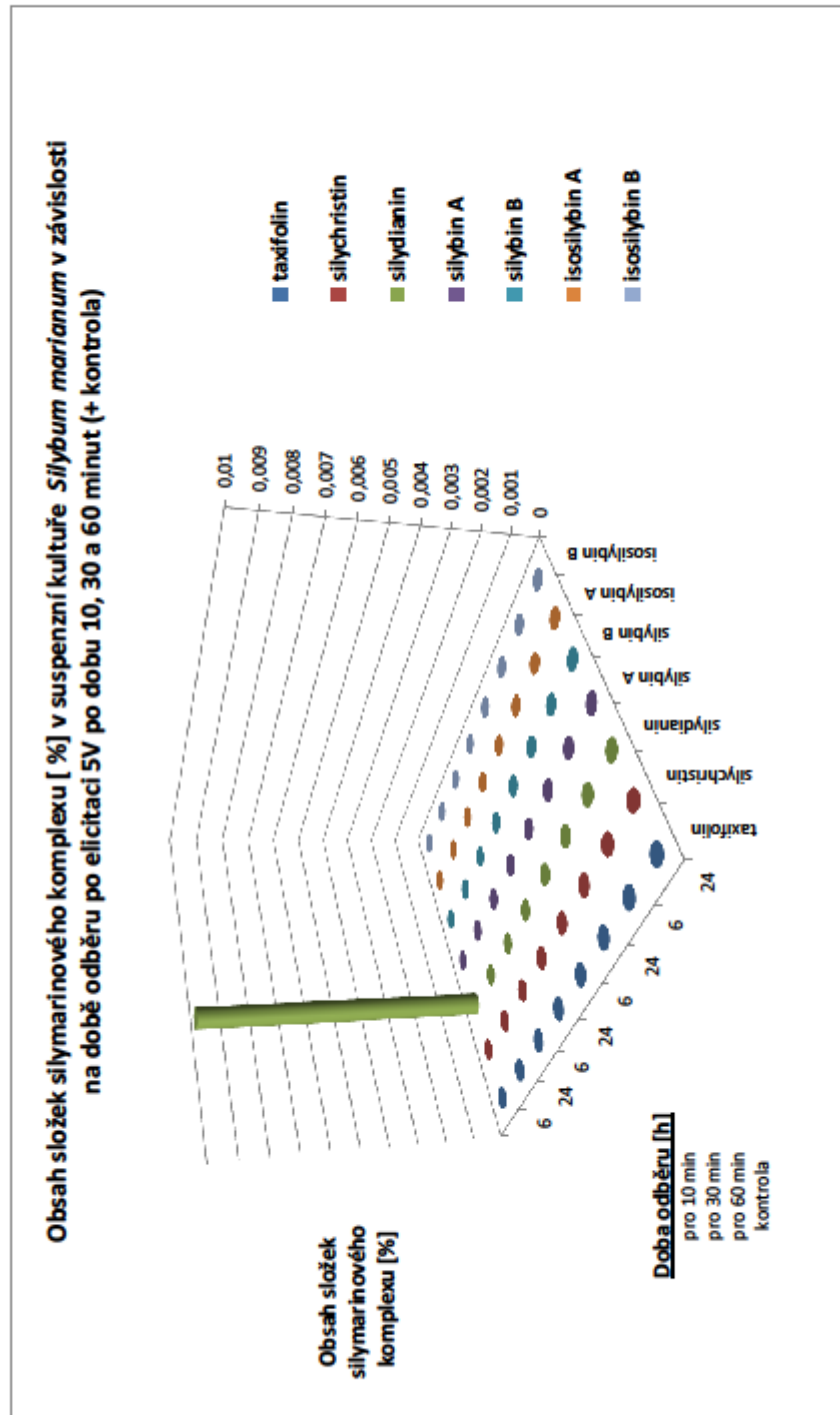
5. VÝSLEDKY

Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu (%) při hodnotě napětí 5V:

Tabulka č. 1

TABULKA č. 1									
hodnota napětí [V]	doba elicitace [min]	hodina odběru [h]	Obsah složek silymarinového komplexu [%] v závislosti na napětí v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i>						
			taxifolin	silychristin	silydianin	silybin A	silybin B	isosilybin A	isosilybin B
5	10	6	0	0	0,01	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
0k	0	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0

Graf č. 1

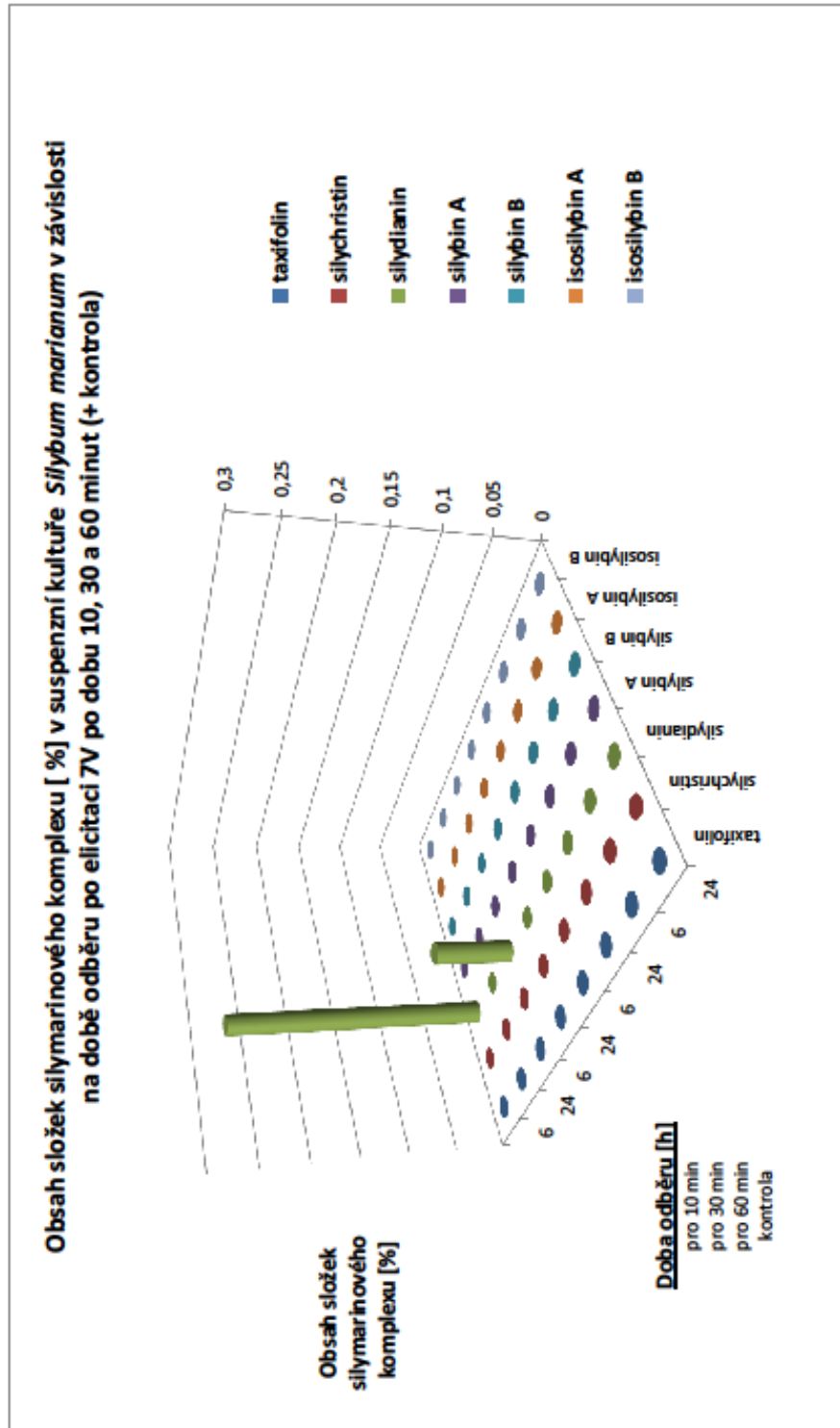


Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu (%) při hodnotě napětí 7V:

Tabulka č. 2

TABULKA č. 2									
hodnota napětí [V]	doba elicitace [min]	hodina odběru [h]	Obsah složek silymarinového komplexu [%] v závislosti na napětí v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i>						
			taxifolin	silychristin	silydianin	silybin A	silybin B	isosilybin A	isosilybin B
7	10	6	0	0	0,27	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	0,08	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
0k	0	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0

Graf č. 2

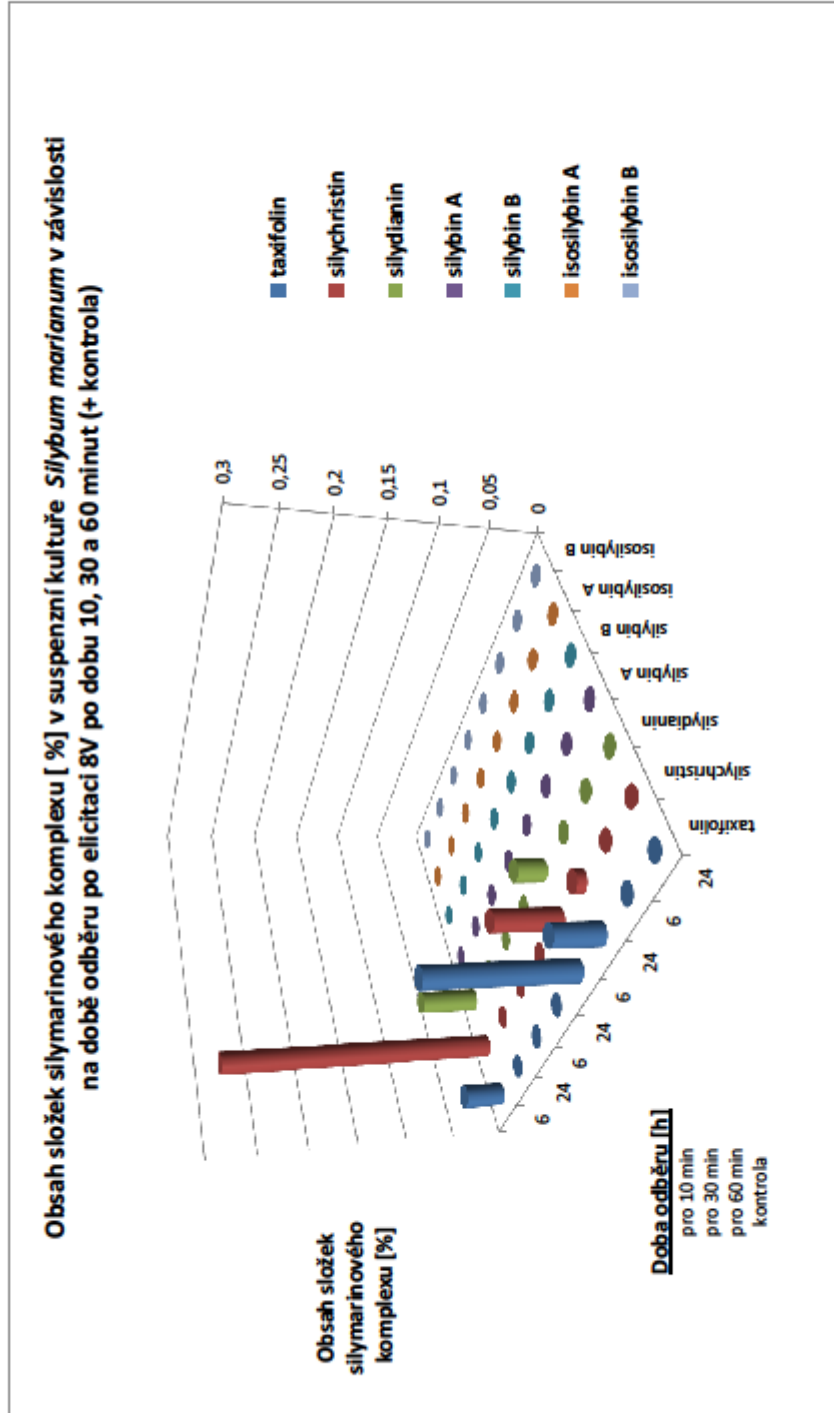


Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu (%) při hodnotě napětí 8V:

Tabulka č. 3

TABULKA č. 3									
hodnota napětí [V]	doba elicitace [min]	hodina odběru [h]	Obsah složek silymarinového komplexu [%] v závislosti na napětí v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i>						
			taxifolin	silychristin	silydianin	silybin A	silybin B	isosilybin A	isosilybin B
8	10	6	0,04	0,28	0,06	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	60	6	0,15	0,07	0,03	0	0	0	0
		24	0,05	0,01	0	0	0	0	0
0k	0	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0

Graf č. 3

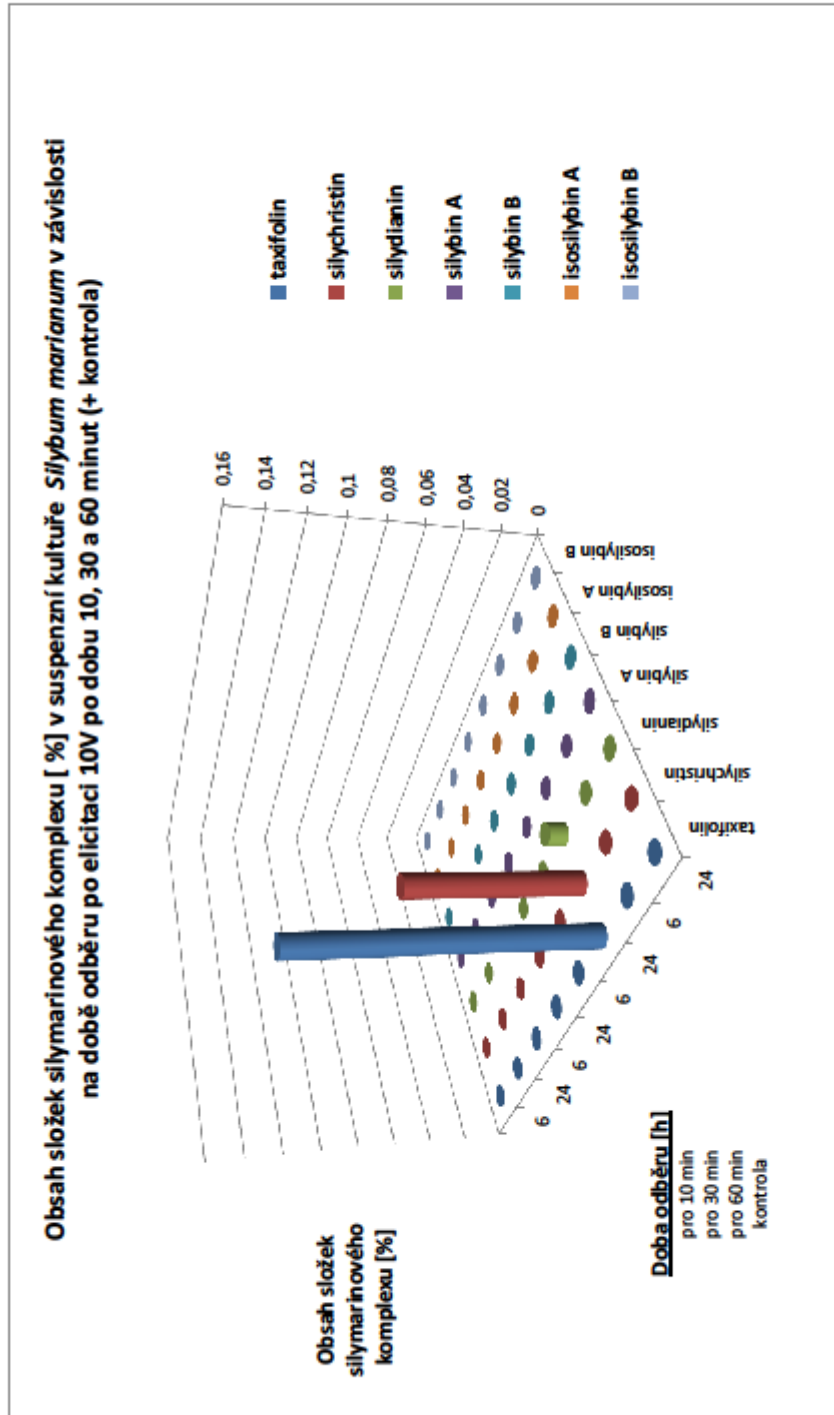


Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu (%) při hodnotě napětí 10V:

Tabulka č. 4

TABULKA č. 4									
hodnota napětí [V]	doba elicitace [min]	hodina odběru [h]	Obsah složek silymarinového komplexu [%] v závislosti na napětí v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i>						
			taxifolin	silychristin	silydianin	silybin A	silybin B	isosilybin A	isosilybin B
10	10	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0,15	0,09	0,01	0	0	0	0
0k	0	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0

Graf č. 4

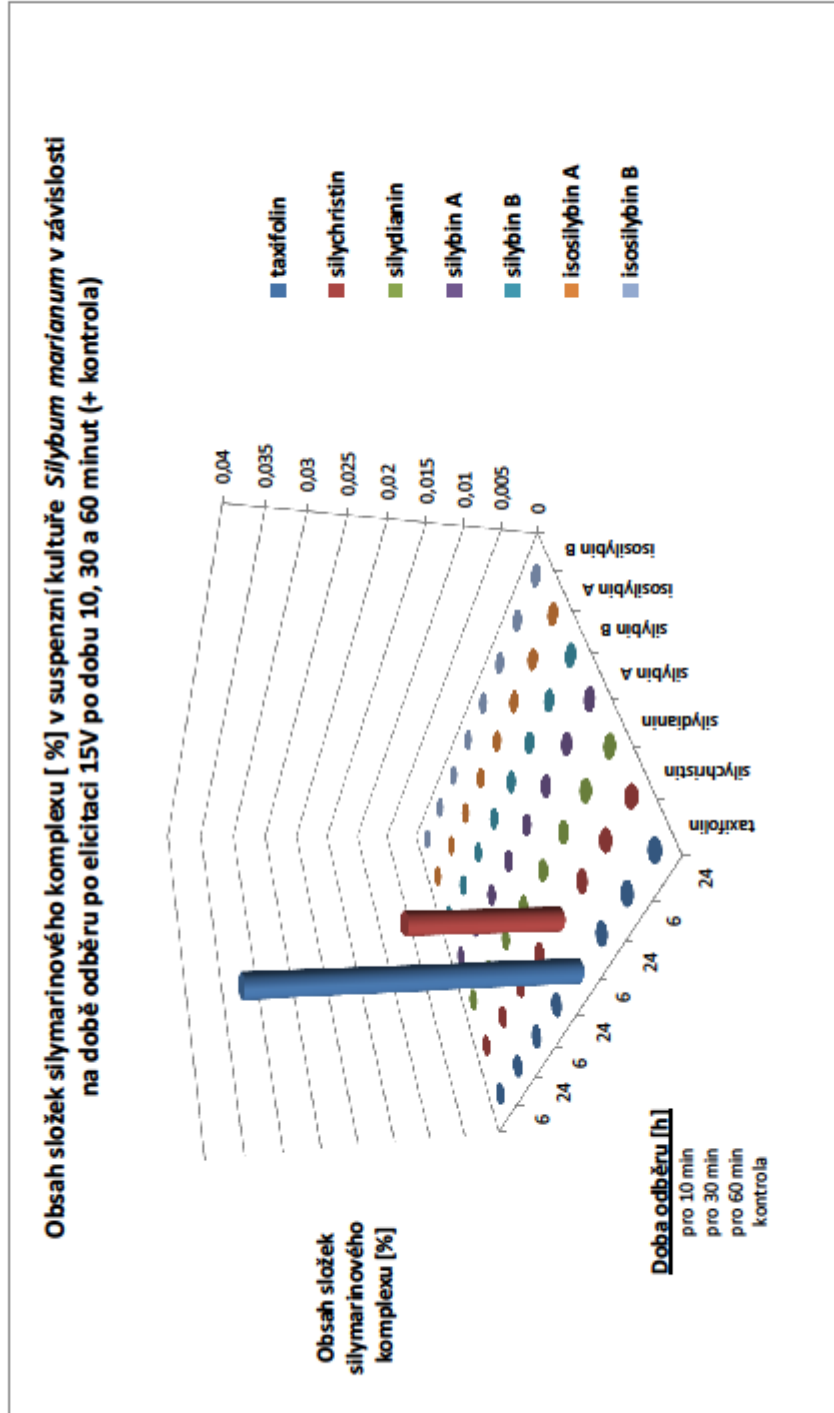


Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu (%) při hodnotě napětí 15V:

Tabulka č. 5

TABULKA č. 5									
hodnota napětí [V]	doba elicitace [min]	hodina odběru [h]	Obsah složek silymarinového komplexu [%] v závislosti na napětí v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i>						
			taxifolin	silychristin	silydianin	silybin A	silybin B	isosilybin A	isosilybin B
15	10	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	60	6	0,04	0,02	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
0k	0	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0

Graf č. 5

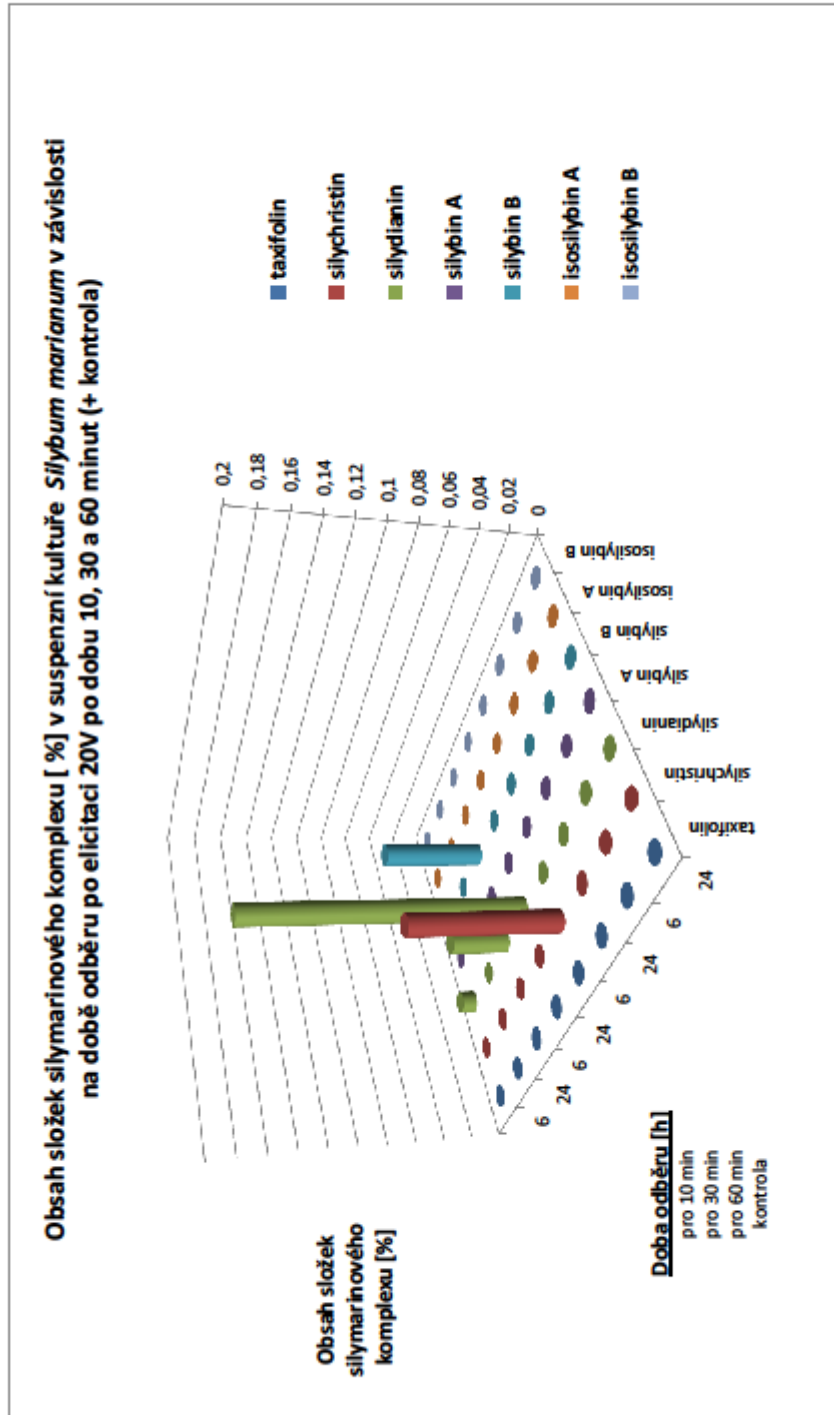


Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu (%) při hodnotě napětí 20V:

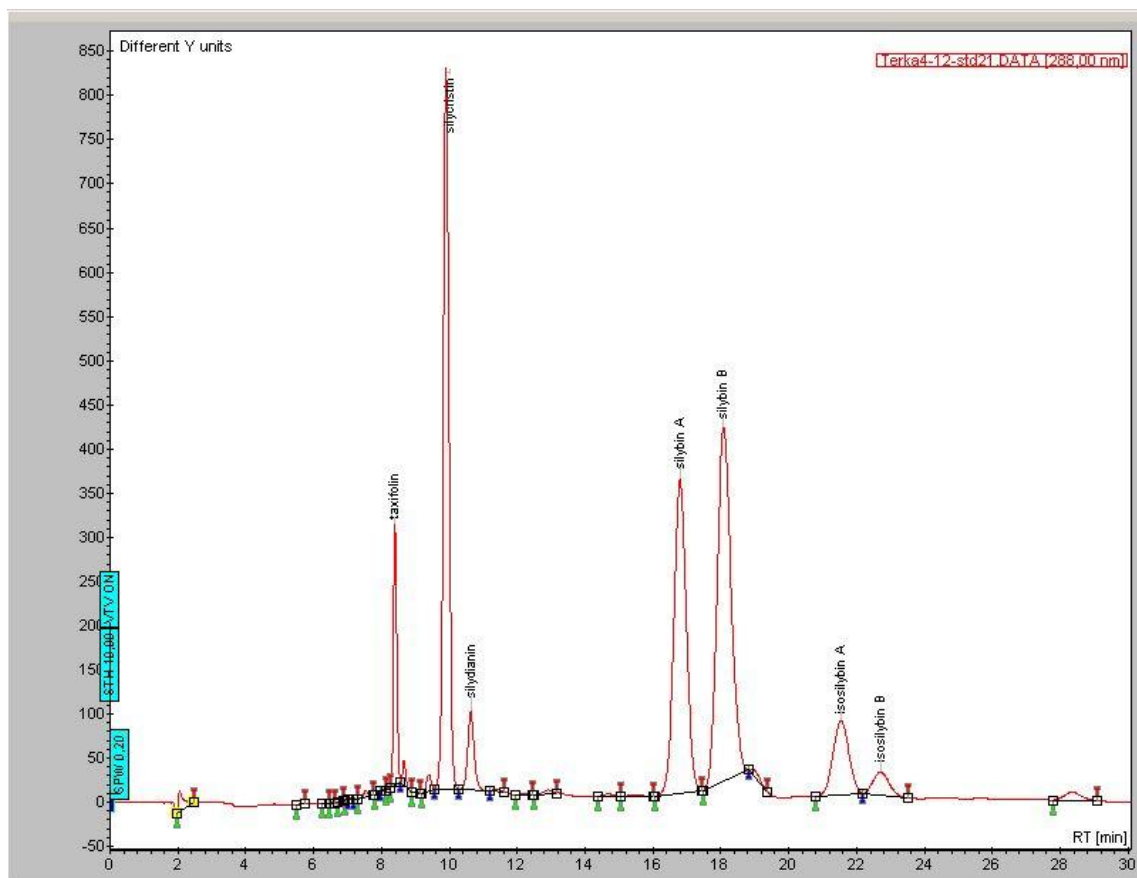
Tabulka č. 6

TABULKA č. 6									
hodnota napětí [V]	doba elicitace [min]	hodina odběru [h]	Obsah složek silymarinového komplexu [%] v závislosti na napětí v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i>						
			taxifolin	silychristin	silydianin	silybin A	silybin B	isosilybin A	isosilybin B
20	10	6	0	0	0,01	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	0,04	0	0,07	0	0
		24	0	0	0,19	0	0	0	0
	60	6	0	0,1	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0
0k	0	6	0	0	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0	0	0

Graf č. 6



Obr. HPLC chromatogram silymarinu



Standard	Retenční čas
1 – taxifolin	9,05
2 – silychristin	10,93
3 - silydianin	11,76
4 – silybin A	16,98
5 – silybin B	18,20
6 – isosilybin A	21,39
7 – isosilybin B	22,48

6. DISKUZE

V posledních letech je stále obtížnější získat sekundární metabolity rostlin, které jsou využívány pro svůj farmakoterapeutický účinek. Jednou z možností, jak zvýšit produkci těchto metabolitů je biotechnologická metoda – elicitace.

Elicitace využívá schopnosti rostlin a rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na stresové podněty řadou obranných reakcí. V důsledku těchto reakcí dochází ke zvýšené biosyntéze sekundárních látek (5).

Cílem mé práce bylo zjistit vliv abiotické elicitace na produkci jednotlivých složek silymarinového komplexu v suspenzní kultuře *Silybum marianum.L.*, která byla kultivována na médiu dle Murashigeho a Skooga. Byl použit abiotický elicitor – elektrický proud s různými hodnotami napětí působící po určitou dobu.

- Proud 50 mA
- Napětí 5, 7, 8, 10, 15, 20, 24V
- Doba elicitace 10, 30, 60 min
- Odběr po 6 a 24 hod

Pro stanovení jednotlivých složek silymarinového komplexu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* byla zvolena metoda HPLC podle ČL 2009.

Statisticky významné hodnoty produkce jednotlivých složek silymarinového komplexu byly zaznamenány po elicitaci elektrickým proudem o napětí 5, 7, 8, 10, 15 a 20V. Při hodnotě napětí 24V nedošlo k žádnému nárůstu obsahových látek. U kontrolních vzorků (bez působení elicitoru) nebyla ovlivněna produkce obsahových látek. Největší nárůst obsahu jednotlivých složek silymarinového komplexu byl zaznamenán po elicitaci elektrickým proudem o napětí 8V (Tab.č. 3) a 10V (Tab.č. 4).

Při hodnotě napětí 8V došlo k významnému nárůstu obsahu taxifolinu, silychristinu a silydianinu po době elicitace 10 a 60 minut. Při napětí 10V byla také zvýšená produkce taxifolinu, silychristinu a silydianinu, ale pouze po době elicitace 60 minut.

Při působení napětí 15V byla zaznamenána vyšší produkce jen taxifolinu a silychristinu a to po 60 minutách (Tab.č. 5). Vlivem elektrického proudu o napětí 20V se zvýšilo množství silychristinu po 60 minutách působení elicitoru, množství silybinu B a silydianinu se zvýšilo pouze po 30 minutách působení elicitoru (Tab.č. 6).

Při hodnotě napětí 5V došlo pouze k nepatrnému nárůstu silydianinu po 10 minutách působení elicitoru (Tab.č. 1).

V živném médiu nebyla detekována zvýšená produkce jednotlivých složek silymarinového komplexu.

Nízká produkce jednotlivých složek silymarinového komplexu může mít několik důvodů. Jedním z nich by mohla být konstantní hodnota elektrického proudu.

Kaimoyo a kol. (6) zkoumali ve své studii vliv různých hodnot elektrického proudu (10, 30, 50 a 100 mA) a napětí (8-24V) na produkci sekundárních metabolitů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L., *Cicer arietinum* L., *Pisum sativum* L. a *Trigonella foenum-graecum* L. Zvýšené množství pistatinu v médiu bylo za 24 hodin po elicitaci 10-13 krát vyšší než u kontrolních vzorků, kde elicitor nepůsobil.

Případná nižší produkce obsahových látek může být zapříčiněna i příliš vysokou hodnotou elektrického proudu.

Scopa a kol. (17) sledovali ve své studii morfologické a fyziologické změny v rostlinných tkáních (*Arundo donax*) v závislosti na působení elektrického pole jako abiotického elicitoru. Zvýšení rychlosti růstu bylo zaznamenáno u výhonků a kořenů ve srovnání s kontrolním vzorkem. Délka kořenů po působení 10 mA jako elicitoru byla od 50-60 cm, zatímco u kontrolních vzorků se délka kořenů zvětšila pouze o 4-7 cm.

Hong Ye a kol. (13) zkoumali efekt střídavého elektrického pole na růst a produkci sekundárních metabolitů v suspenzní kultuře *Taxus chinensis*. Buněčné kultury byly vystaveny 50 Hz, 10 V/m po různou časovou periodu. Zvýšená akumulace sekundárních metabolitu (taxuyunnaninu C) byla významná v exponenciální fázi po působení elektrického proudu po dobu 30 minut. Ve srovnání s kontrolou byla produkce zvýšena o 30 %.

Dalším důvodem nízké produkce látek může být i stáří kultury. V mé práci jsem použila suspenzní kulturu v 51.- 58. pasáži.

Tůmová a kol.(18) ve své práci použila tkáňovou kulturu *Silybum marianum* v 34.-40. pasáži.

Další z důvodů nízké produkce sekundárních metabolitů může být nevhodně zvolený elicitor.

Tůmová a kol. (19) použili substituované pyrazinkarboxamidy jako abiotické elicitory produkce flavonolignanů v kalusové kultuře *Silybum marianum*. Elicitory byly testovány ve třech různých koncentracích po různou časovou periodu. Při určitých koncentracích elicitorů kultura produkovala zvýšené množství flavonolignanů.

Gramanová H. (20) zkoumala ve své práci vliv kyseliny acetylsalicylové ve třech různých koncentracích na obsah účinných látek v semeni *Silybum marianum*. Při vyšších koncentracích kyseliny acetylsalicylové (10^{-3} mol/l) byl zaznamenán zvýšený obsah účinných látek.

7. ZÁVĚR

Zhodnocení výsledků experimentální práce:

Významný nárůst obsahu jednotlivých složek silymarinového komplexu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* byl zaznamenán po působení elektrického proudu o intenzitě 50 mA a napětí 8 a 10V.

Působením elektrického proudu při hodnotě napětí 8V po dobu 10 minut byla zaznamenána zvýšená produkce jednotlivých složek silymarinového komplexu, konkrétně taxifolinu (0,04 %), silychristinu (0,28 %) a silydianinu (0,06 %).

Po elicitaci elektrickým proudem po dobu 60 minut byla zaznamenána zvýšená produkce jednotlivých složek silymarinového komplexu u dvou hodnot napětí a to 8V a 10V. Pro hodnotu 8V byl statisticky významný nárůst produkce jednotlivých složek silymarinového komplexu po odběru jak po 6 hodinách (taxifolin 0,15 %, silychristin 0,07 %, silydianin 0,03 %) tak i po 24 hodinách a to pouze u taxifolinu (0,05 %) a silychristinu (0,01 %). Vlivem napětí 10V po dobu 60 minut byl detekován nárůst obsahu složek silymarinového komplexu pouze po odběru po 24 hodinách (taxifolin 0,15 %, silychristin 0,09 %, silydianin 0,01 %).

8. SEZNAM LITERATURY

1. Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J.: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 272-273, 426-430 (1998).
2. Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 13-18, 32-34, 41, 50-53, 79-80 (1995).
3. Pavlová L.: Fyziologie rostlin, Karolinum Praha, 142-143, 160 (2005).
4. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha, 75-82, (2001).
5. Kašparová M., Siatka T.: Abiotická elicitace explantátové kultury *Rheum palmatum* L. těžkými kovy, Česká a slovenská farmacie, 53, 252-255 (2004).
6. Kaimoyo E., Farag A. M., Sumner L. W., Wasmann C., Cello J. L., VanEtten H.: Sub-lethal Levels of Electric Current Elicit the Biosynthesis of Plant Secondary Metabolites, Biotechnological Progress , 24, 377-384 (2008).
7. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Journal of Plant Physiology, 15, 473 (1962).
8. www.sukl.cz, SPC Silymarin AL (05. 04. 2011).
9. Luštinec J., Žárský V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin, Karolinum, 235-236, (2003).
10. Klemera P., Klemmerová V.: Základy aplikované statistiky pro studující farmacie, Karolinum Praha, 23, 27 (1997).

11. Reisenauer R.: Metody matematické statistiky, SNTL Praha, 78-81 (1970).
12. Kolektiv autorů: Český lékopis 2009, svazek 1., 3., Grada Praha, 3144-3147 (2009).
13. Hong Ye, Lin-Ling Huang, Shu-De Chen, Jian-Jiang Zhong : Pulsed Electric Field Stimulates Plant Secondary Metabolism in Suspension Cultures of *Taxus Chinensis* , Biotechnology and Bioengineering, 788-795 (2004).
14. Klimeš J.: Kontrola léčiv I., Karolinum Praha, 22-36 (2002).
15. http://rustreg.upol.cz/vyuka/fyziologie_rostlin/FZRSB_Fyziologie_stresu.pdf (05. 04. 2011).
16. Marek J. a kol.: Farmakoterapie vnitřních nemocí, Grada Publishing, a.s., 221 (2010).
17. Scopa A., Colacino C., Lumaga M. R. B., Pariti L., Martelli G.: Effects of a weak DC electric field on root growth in *Arundo donax* (Poaceae), Acta Agriculturae Scandinavica Section B – Soil and Plant Science, 1-4 (2009).
18. Tůmová L., Tůma J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat, Chemické Listy 103, 503-510 (2009).
19. Tůmová L., Tůma J., Megušar K., Doležal M.: Substitued Pyrazinecarboxamides as Abiotic Elicitors of Flavolignan Production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn Cultures *in Vitro*, Molecules, 15, 331-340 (2010).

20. Gramanová H.: Technologie pěstování ostropestřece mariánského *Silybum marianum* ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování, Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice (2009).
21. Macholán L.: Sekundární metabolity, Vydavatelství Masarykovy univerzity, 123-124, (2003).
22. Jegorov A.: Flavanolignany- novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem, Chemické Listy 90, 859 (1996).
23. www.sportvital.cz (12. 04. 2011).

9. ABSTRAKT

Elicitace je metoda, která může ovlivnit produkci sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních. Jednou z možností elicitace je působení elektrického proudu s různým rozsahem hodnot napětí. *In vitro* kultury *Silybum marianum* kultivované na médiu dle Murashigeho a Skooga byly vystaveny elektrickému proudu o intenzitě 50 mA a hodnotách napětí 5, 7, 8, 10, 15, 20 a 24V po dobu 10, 30 a 60 minut. Množství jednotlivých složek silymarinového komplexu bylo analyzováno metodou HPLC. Nejvyšší nárůst taxifolinu (0,04 %), silychristinu (0,28 %), silydianinu (0,06 %) v suspenzní kultuře byl zaznamenán po elicitaci elektrickým proudem o napětí 8V po dobu působení 10 min a době odběru 6 hodin. Další zvýšení obsahu jednotlivých složek silymarinového komplexu (taxifolin, silychristin, silydianin) bylo zaznamenáno při působení elektrického proudu o napětí 8V (60 minut, 6 hodin) a 10V (60 minut, 24 hodin). Ostatní testované hodnoty napětí elektrického proudu neovlivnily významně nárůst obsahových látek.

Elicitation is the method to increase the production of secondary metabolites in plant tissue. Elicitation by electric field is one of the method of abiotic elicitation to stimulate plants to produce higher amount of secondary metabolites. *In vitro* cultures of *Silybum marianum* were cultivated on Murashige-Skoog medium. Suspension cultures were exposed to electric field (50 mA, voltage 5, 7, 8, 10, 15, 20, 24 V) during 10, 30 and 60 minutes. The content of silymarin complex components was measured by (HPLC). The maximal content of taxifolin (0.04 %), silychristin (0.28 %), silydianin (0.06 %) in suspension culture was detected after elicitation by electric field 8V (10 minutes, 6 hours). The maximal content of taxifolin, silychristin, silydianin in suspension culture was detected after elicitation by electric field 8V (60 minutes, 6 hours) and 10V (60 minutes, 24 hours). The significant increase of silymarin complex components were not detectable after the other values of voltage .