

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**ELICITACE PRODUKCE BIOAKTIVNÍCH LÁTEK
V *IN VITRO* KULTURÁCH *PANAX GINSENG***

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Eliška Syslová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním 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.

Datum:

Podpis:

Souhlasím, aby moje práce byla volně k dispozici k nahlédnutí ke studijním účelům.

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala RNDr. Tomáši Vaňkovi, CSc. za umožnění práce v Laboratoři rostlinných biotechnologií v Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky v Praze.

Děkuji své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. a své školitelce – specialistce Ing. Lence Langhansové, Ph.D., za jejich ochotu, trpělivost, cenné rady a věnovaný čas. Děkuji Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D., za provedení UPLC analýz, jakož i všem ostatním pracovníkům Laboratoře rostlinných biotechnologií za veškeré připomínky a návrhy při řešení úkolu a vyhodnocování výsledků při vypracovávání diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Eliška Syslová

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Elicitace produkce bioaktivních látek v *in vitro* kulturách *Panax ginseng*

Tato diplomová práce je zaměřena na problematiku ovlivnění biosyntézy sekundárních metabolitů *Panax ginseng* C. A. Meyer a zabývá se zvýšením produkce biologicky aktivních polyacetylenů a ginsenosidů v *in vitro* kořenových kulturách pomocí různých elicitorů.

Byl sledován vliv koncentrace elicitorů a vliv regulátorů růstu na produkci biomasy a sekundárních metabolitů. Ginsenosidy a polyacetyleny jsou nositelé hlavních farmakologických účinků *Panax ginseng*.

Kořenové kultury byly pěstovány v tekutém médiu ve tmě při 24 ± 1 °C. Během 27. dne proběhla sterilní elicítace a o týden později sklizeň.

Vzorky byly zpracovány dle optimalizovaného postupu zvlášť pro UPLC analýzu ginsenosidů a zvlášť pro UPLC analýzu polyacetylenů.

Přítomnost jednotlivých elicitorů ovlivňovala nárůst biomasy i množství ginsenosidů a polyacetylenů ve vzorcích.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Eliška Syslová

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Thesis title: Elicitation of bioactive compounds production in *in vitro* cultures of *Panax ginseng*

This diploma thesis is focused on the study of affecting the biosynthesis of secondary metabolites of *Panax ginseng* C. A. Meyer and is focused on increasing the production of biologically active polyacetylenes and ginsenosides in *in vitro* root cultures by various elicitors.

The effect of the concentration of elicitors and growth regulators on the production of root biomass and secondary metabolites was researched. The carriers of the main pharmacological actions of *Panax ginseng* are ginsenosides and polyacetylenes.

The root cultures were cultivated in the liquid medium in the dark at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. During the 27 day the sterile elicitation was done and a week later it was harvested.

The samples were processed according to the optimized procedure, separately for UPLC analysis of ginsenosides and UPLC analysis of polyacetylenes as well.

The presence of individual elicitors influenced the growth of biomass and the amount of ginsenosides and polyacetylenes in the samples.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část	9
2.1. CHARAKTERISTIKA <i>PANAX GINSENG</i> JAKO LÉČIVÉ ROSTLINY	9
2.2. HISTORIE UŽÍVÁNÍ <i>PANAX GINSENG</i>	12
2.3. BIOLOGICKY AKTIVNÍ KOMPONENTY <i>PANAX GINSENG</i>	13
2.3.1. GINSENO SIDY	13
2.3.2. POLYACETYLENY	17
2.4. FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY <i>PANAX GINSENG</i>	19
2.4.1. Efekt na centrální nervovou soustavu	19
2.4.2. Efekt na kardiovaskulární systém	19
2.4.3. Analgetický účinek.....	20
2.4.4. Cytotoxicita a protinádorová aktivita.....	20
2.4.5. Antidiabetický účinek	20
2.4.6. Protizánětlivý účinek.....	20
2.4.7. Antioxidační účinek a dlouhověkost.....	21
2.4.8. Ostatní účinky	21
2.5. INTERAKCE S LÉČIVY.....	23
2.5.1. Interakce s warfarinem, heparinem a aspirinem	23
2.5.2. Interakce s ostatními léčivy a alkoholem	24
2.6. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	25
2.7. PĚSTOVÁNÍ <i>PANAX GINSENG IN VITRO</i>	26
2.7.1. Produkce sekundárních metabolitů	26
2.7.2. Složení živného média a kultivační podmínky	27
2.7.3. Elicitace kultur <i>Panax ginseng in vitro</i>	30
3. Cíl diplomové práce.....	34
4. Experimentální část	35
4.1. MATERIÁL, POMŮCKY, PŘÍSTROJE	35
4.1.1. Biologický materiál	35
4.1.2. Pomůcky a přístroje.....	35

4.1.3.	Chemikálie	36
4.2.	METODIKA PRÁCE	38
4.2.1.	Příprava experimentu	38
4.2.2.	Elicitace	38
4.2.3.	Sklizeň kořenů.....	38
4.2.4.	Příprava vzorků k analýze ginsenosidů	39
4.2.5.	UPLC analýza ginsenosidů	39
4.2.6.	Extrakce k analýze polyacetylenů	40
4.2.7.	UPLC analýza polyacetylenů	40
4.2.8.	Příprava vzorků na testování biologické aktivity	41
4.2.9.	Test biologické aktivity	41
5.	Výsledky	44
5.1.	Vliv elicitorů na nárůst kořenné biomasy <i>Panax ginseng</i>	44
5.2.	Vliv koncentrace elicitoru na množství ginsenosidů <i>Panax ginseng</i>	47
5.1.	Vliv elicitorů na obsah polyacetylenů v kulturách <i>Panax ginseng</i>	50
5.1.	Schopnost elicitovaných kořenových kultur <i>Panax ginseng</i> inhibovat COX-2.	52
5.2.	Schopnost elicitovaných kořenových kultur <i>Panax ginseng</i> inhibovat proliferaci nádorových buněk	53
6.	Diskuze	54
7.	Závěr	58
8.	Seznam zkratk	59
9.	Seznam použité literatury	60

1. Úvod

Rostliny byly od nepaměti základním a nejdůležitějším zdrojem léčivých látek a přípravků. I v dnešní moderní době je na vzestupu využití alternativní medicíny a doplňků stravy založených na látkách rostlinného původu. V USA více než 40 % lidí využívá alternativní a bylinné terapie (Taik-Koo, 2001).

Žeňšen (*Panax ginseng*) je rostlina s tisíciletou historií. Už v Orientu byl *Panax ginseng* používán pro revitalizaci těla, zvýšení fyzické síly a předcházení stárnutí.

Dnes už je prokázáno, že *Panax ginseng* pozitivně ovlivňuje různé životně důležité systémy lidského těla. *Panax ginseng* pozitivně ovlivňuje mozkové funkce, krevní tlak, vnímání bolesti, vykazuje estrogenní aktivitu, významné je jeho protirakovinné a protizánětlivé působení. Ginsenosidy a polyacetyleny byly identifikovány jako hlavní obsahové látky *Panax ginseng* s prokazatelnými farmakologickými účinky (Choi, 2008).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala problematikou ovlivnění biosyntézy biologicky aktivních látek. Zkoumala jsem možnosti zvýšení produkce sekundárních metabolitů, ginsenosidů a polyacetylenů v *in vitro* kořenových kulturách *Panax ginseng*. K tomu jsem využila různé druhy biotických i abiotických elicitorů a regulátorů růstu. Následně byla u kořenových kultur pěstovaných za různých podmínek porovnána jejich schopnost inhibice cyklooxygenasy 2 (COX-2) a jejich antiproliferační působení na dvou střevních nádorových liniích.

2. Teoretická část

2.1. CHARAKTERISTIKA *PANAX GINSENG* JAKO LÉČIVÉ ROSTLINY

Panax ginseng je unikátní bylina. Východní medicína ji považuje za nejvzácnější ze všech tradičních léků (Fulder, 1998). Je to jedna z nejvíce medicínsky a nutraceuticky oceňovaných rostlin (Choi, 2008).

Latinský název *Panax ginseng* lze volně přeložit jako všehoj léčivý, všelék. Slovo *Panax* je složeno z řeckého „pan“ (= vše) a „axos“ (= léčit) (Choi, 2008). *Rén-shén* (*rén* = člověk; *shén* = rádce, život, identita; ve smyslu přírodního ducha) znamená člověčí kořen i sílu země v podobě člověka (Janča, Zentrlich, 1997).

Roku 1843 *Panax ginseng* klasifikoval ruský botanik Carl Anton Meyer zavedením rodu *Panax* v čeledi *Araliaceae*. Na jeho počest vznikl přívlastek C. A. Meyer (Janča, Zentrlich, 1997).

Tab. 1: Botanická klasifikace *Panax ginseng* (Bacílková, 2009; Itis, 2016)

VĚDECKÁ KLASIFIKACE		
Nadříše	<i>Eucaryonta</i>	jaderní
Říše	<i>Plantae</i>	rostliny
Podříše	<i>Tracheobionta</i>	cévnaté rostliny
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	krytosemenné
Třída	<i>Magnoliopsida</i>	dvouděložné
Podtřída	<i>Rosidae</i>	vyšší dvouděložné
Řád	<i>Apiales</i>	miříkovité
Čeleď	<i>Araliaceae</i>	aralkovité
Rod	<i>Panax</i>	ženšen
Binomické jméno	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	

Ženšen je vytrvalá rostlina s jedním štíhlým, napřímeným, cca 0,5 m dlouhým stonkem. Ten nese 4 – 5 dlouho-řapíkatých listů, jež jsou sestaveny z pěti lístků. Ženšen má oboupohlavné květy, které vytvářejí bobulovité plody (peckovice) (Janča et al., 1997). Je to samosprašná rostlina. Začíná kvést ve třetím roce růstu a rozkvétá v polovině května (Choi, 2008).

Při sběru jsou semena většinou získána ze čtyřleté rostliny. Sbírají se z červených plodů, přičemž v každém jsou dvě světle žlutá semena. Semena se sbírají ještě ne zcela vyzrálá. Nechávací se dozrát ve speciálních kontejnerech v písku po dobu asi 100 dnů (Choi, 2008).

Kořeny jsou bledě žluto-bílé. Vytváří kořen hlavní s 2 – 5 kořínky vedlejšími a kořenovými vlásky. Jejich velikost a tvar závisí především na kvalitě půdy, počasí, umělých hnojivech a obsahu vody. Kořeny se sklízí během 4. – 6. roku věku. Šestileté kořeny jsou klasifikovány jako oddenky s primárními kořeny a kořínky, tvarem připomínající tvar lidského těla (Choi, 2008). Traduje se, že je *Panax ginseng* tím účinnější, čím více se kořen lidské postavě podobá (Heinerman, 2001). Kořen dorůstá kolem 34 cm, váží 70 – 100 g, některé ale až 500 g (Choi, 2008).

Každé jaro se na oddenku tvoří nové pupeny, které na podzim vadnou a odumírají. Na oddenku zůstávají jizvy vypovídající o kvalitě, velikosti i tvaru oddenku. Tady platí, že čím více jizev, tím lépe (Choi, 2008).

Panax ginseng je rozšířen především v Asijských zemích: Korea, Čína, Japonsko (Choi, 2008). Dnes se pěstuje hlavně v horských oblastech od Nepálu k Mandžusku a od východní Sibíře ke Koreji. Na trhu se ale nejvíce vyskytuje druh pěstovaný v USA (Jahodář, 2006).

Tab. 2: Druhy rodu *Panax* (Taik-Koo, 2001)

BOTANICKÝ NÁZEV	ANGLICKÝ NÁZEV
1. <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	Korean ginseng
2. <i>Panax japonicus</i> C. A. Meyer	Japanese ginseng
3. <i>Panax major</i> Ting	
4. <i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F. H. Chen	Sanchi ginseng
5. <i>Panax omeiensis</i> J. Wen	
6. <i>Panax pseudoginseng</i> Wallich	
7. <i>Panax quinquefolius</i> L.	American ginseng
8. <i>Panax sinensis</i> J. Wen	
9. <i>Panax stipuleanatus</i> H. T. Tsai & K. M. Feng	
10. <i>Panax trifolius</i> L.	Dwarf ginseng
11. <i>Panax wangianus</i> Sun	
12. <i>Panax zingiberensis</i> C. Y. Wu & K. M. Feng	
13. <i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.	Vietnamese ginseng

Lékopisnou drogu tvoří kořeny = Ginseng radix. Je to usušený, celý nebo řezaný kořen druhu *Panax ginseng* C. A. Meyer (Český lékopis, 2009). Podle způsobu zpracování kořenu rozlišujeme dva tradiční přípravky: bílý a červený ženšen. Bílý je loupaný a sušený kořen. Červený vzniká ponořením čerstvého kořene do páry 98 – 100 °C na 2 – 3 hodiny a následným sušením, dokud se nedosáhne vlhkosti <15 %. Bylo prokázáno, že oba mají imunomodulační, protizánětlivé, antioxidační a antiatopické účinky (Kim, 2015).

V droze je identifikováno velké množství látek: polysacharidy, vitaminy, steroly, aminokyseliny a peptidy, silice, polyacetyleny a saponiny. Celou skupinu saponinů označujeme ginsenosidy (Jahodář, 2006). Červený ženšen vykazuje v některých ohledech silnější farmakologický efekt, což je způsobeno chemickou změnou ginsenosidů po vaření v páře. Ginsenosidy se mění na deglykosylované ginsenosidy, které vykazují větší absorpci a biologickou dostupnost (Kim, 2015).

2.2. HISTORIE UŽÍVÁNÍ *PANAX GINSENG*

Původ *Panax ginseng* sahá až do pravěku. Už Žlutý císař v Číně kolem r. 5500 př. n. l. sepsal 365 druhů bylin a rozdělil je podle toxicity do 3 skupin. Kořen ženšenu je zde zmíněn jako netoxický, s vynikajícími účinky pro posílení vitální energie s možností pravidelného užívání. *Panax ginseng* byl používán především jako tonikum pro posílení slabého těla než v léčebném lékařství. V roce 1610 byl součástí 653 (16,6 %) z celkových 3944 předpisů korejského bylináře Huh Joona (Yun, 2001).

Dle legendy byl ženšen objeven ve vesnici Shantang v Číně. Vesničany pravidelně v noci budilo zvláštní vytí. Až to nevydrželi, sešli se a šli po hlase. Zjistili, že vytí vychází z rostliny, kterou začali kopat. Vykopali kořen podobající se lidskému tělu. Pojmenovali ho „duch země“ (Fulder, 1998).

V dobách impéria se za starý divoký kořen ženšenu platilo 250 krát více než za stříbro stejné váhy (Fulder, 1998).

Už v roce 1897 byly provedeny první pokusy kultivace ženšenu v botanické zahradě na Jamajce, protože množství divoce rostoucího ženšenu nebylo dostatečné pro uspokojení poptávky (Taik-Koo, 2001).

2.3. BIOLOGICKY AKTIVNÍ KOMPONENTY PANAX GINSENG

2.3.1. GINSENO SIDY

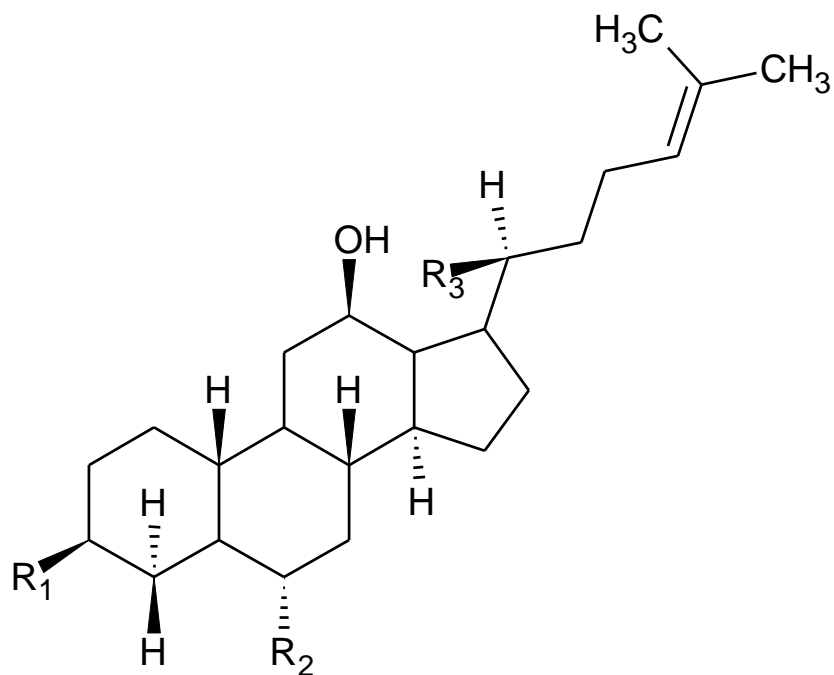
Ginsenosidy patří mezi saponiny. Saponiny jsou povrchově aktivní látky široce rozšířené především v rostlinné říši. Slovo „saponin“ je odvozeno z latinského *sapo* = mýdlo, protože molekuly saponinů, stejně jako mýdlo díky polárním a nepolárním koncům molekuly ve vodě pění. Saponiny mají pestrou škálu dalších vlastností: sladkost a hořkost, emulgační schopnost, hemolytické, antimikrobní, insekticidní vlastnosti. Našly široké uplatnění v nápojích a cukrářské výrobě, v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (Vincken et al., 2007). Saponiny dělíme dle molekuly aglykonu na steroidní a triterpenické (Sparg et al., 2004).

Přestože druh *Panax* má dlouhou historii praktického užívání, vědci odhalili jeho chemické složení až v polovině 19. století. Do roku 2012 bylo izolováno 289 čistých saponinů (Yang et al., 2014). Z rodu *Panax* bylo izolováno přes 150 ginsenosidů, v kořenech *Panax ginseng* bylo identifikováno asi 40 z nich (Peng et al., 2012).

Ginsenosidy neboli ženšenové saponiny mají hlavní úlohu v biochemických i farmakologických účincích *Panax ginseng* (Peng et al., 2012). Jsou to agonisté steroidních receptorů (Yang et al., 2014).

2.3.1.1. Chemická struktura ginsenosidů

Známé ginsenosidy můžeme klasifikovat podle necukerných zbytků na typ dammaran a oleanan (Christensen et al., 2009). Dále do čtyř různých podtypů: typ protopanaxadiol, protopanaxatriol, pseudoginsenosid a typ oleanolové kyseliny (Yang et al., 2014). Na aglykony ginsenosidů bývají navázány oligosacharidy (Yang et al., 2014). Během extrakce kyselou hydrolýzou nebo působením endogenních glykosidas mohou být zbytky cukru odštěpeny až do poskytnutí odpovídajícího aglykonu (Peng et al., 2012).

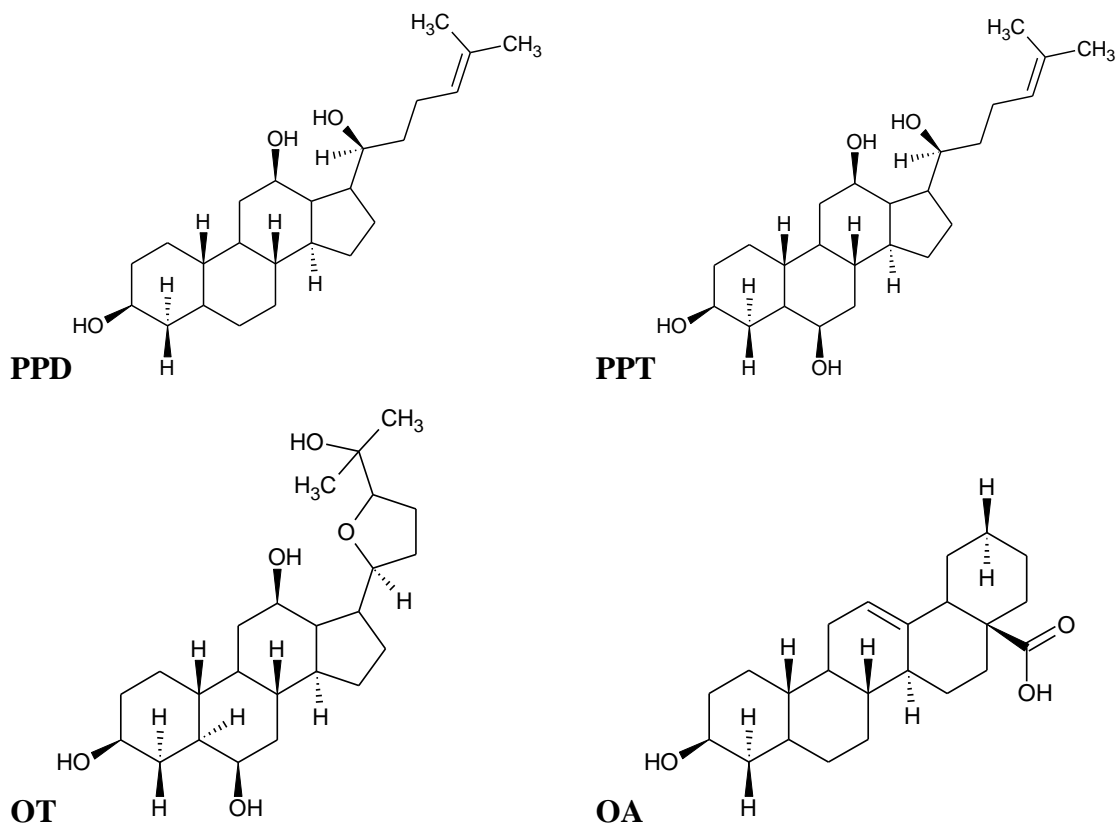


GINSENOSID	R ₁	R ₂	R ₃
Rb ₁	O- Glc (2→1) Glc	H	O- Glc (6→1) Glc
Rb ₂	O- Glc (2→1) Glc	H	O- Glc (6→1) Ara(p)
Rb ₃	O- Glc (2→1) Glc	H	O- Glc (6→1) Xyl
Rc	O- Glc (2→1) Glc	H	O- Glc (6→1) Ara(f)
Rd	O- Glc (2→1) Glc	H	O- Glc
Re	OH	O- Glc (2→1) Rha	O- Glc
Rg ₁	OH	O- Glc	O- Glc
Rg ₃	O- Glc (2→1) Glc	H	OH
Rh ₂	O- Glc	H	OH

Obr. 1: Chemická struktura bioaktivních ginsenosidů (Christensen et al., 2009)

(Glc = β- D- glukosa; Ara(p) = α- L- arabinopyranosa; Ara(f) = α- L- arabinofuranosa;

Rha = α- L- rhamnosa; Xyl = β- D- xylopyranosa)



Obr. 2: Čtyři podtypy ginsenosidů (Yang et al., 2014)

(OA = kyselina oleanová, OT = pseudoginsenosid, PPD = protopanaxadiol,
PPT = protopanaxatriol)

2.3.1.2. Obsah ginsenosidů v *Panax ginseng*

Množství i kvalitu jednotlivých ginsenosidů v *Panax ginseng* ovlivňují biologické a environmentální podmínky (typ půdy, teplota, intenzita světla, množství světla a množství vody), rovněž druh, věk a část rostliny, z které izolujeme, sezóna sklizně, způsob pěstování a prostředky pro uchovávání. Například obsah Rg₁ a Rd je vyšší u divoce rostoucích než u kultivovaných kořenů, zatímco obsah Rc a Rb₁ je v divoce rostoucím *Panax ginseng* nižší než v kultivovaném (Peng et al., 2012).

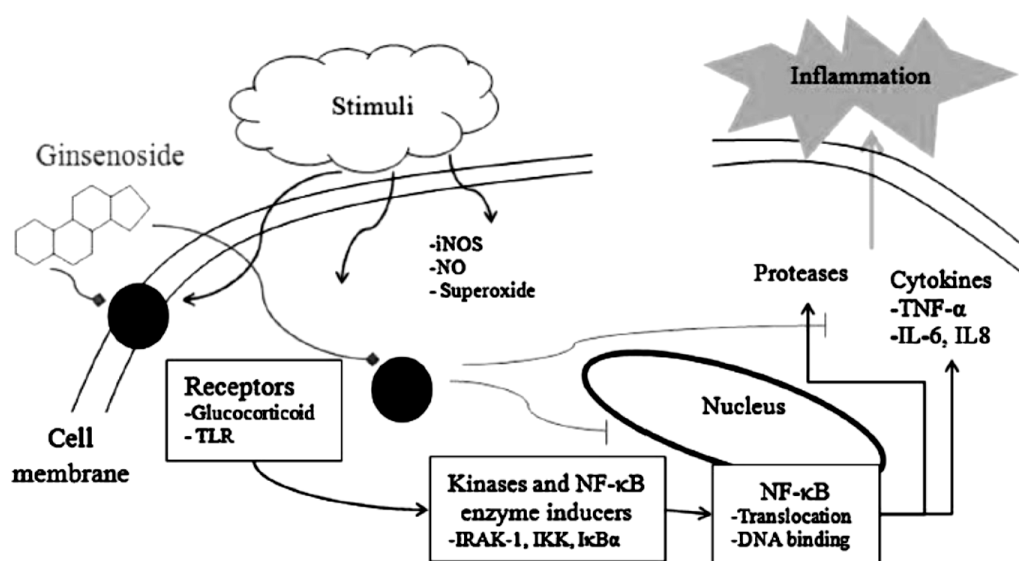
Složení ginsenosidů v kořenech kultivovaných *in vitro* a v kořenech nativního *Panax ginseng* je téměř identické. I při dlouhodobé kultivaci si *in vitro* kořeny uchovávají stejnou produkci sekundárních metabolitů (Langhansová et al., 2005).

Dnes jsme schopni produkovat hladinu ginsenosidů až v hodnotě 2,28 % suché hmotnosti, což je srovnatelné s produkcí nativních kořenů (Langhansová et al., 2012). Během pěstování v bioreaktorech při určitém složení živného média lze výtěžek

ginsenosidů i zvýšit (Sivakumar et al., 2005). Pěstování adventivních kořenů *in vitro* není příliš nákladné. Při využití bioreaktorů jde o produkci bez pesticidů, bez ničení životního prostředí (Sivakumar et al., 2005).

2.3.1.3. Farmakokinetika a metabolismus ginsenosidů

Většina produktů a doplňků stravy na bázi *Panax ginseng* se užívají perorálně. Většinou tedy dochází k metabolizaci obsahových látek již při styku s žaludečními tekutinami a enzymy gastrointestinálního traktu. Velká část inaktivních glykosylovaných ginsenosidů je přeměněna na více biologicky aktivní deglykosylované ginsenosidy. Ty jsou snadněji absorbovány do krevního řečiště. Bylo prokázáno, že ginsenosid Rh₂ je mnohem více účinný proti nádorovým buněčným liniím než intaktní glykosylovaný ginsenosid Rb₁ (Christensen, 2009).



Obr. 3: Mechanismus účinku ginsenosidů (Shergis et al., 2014)

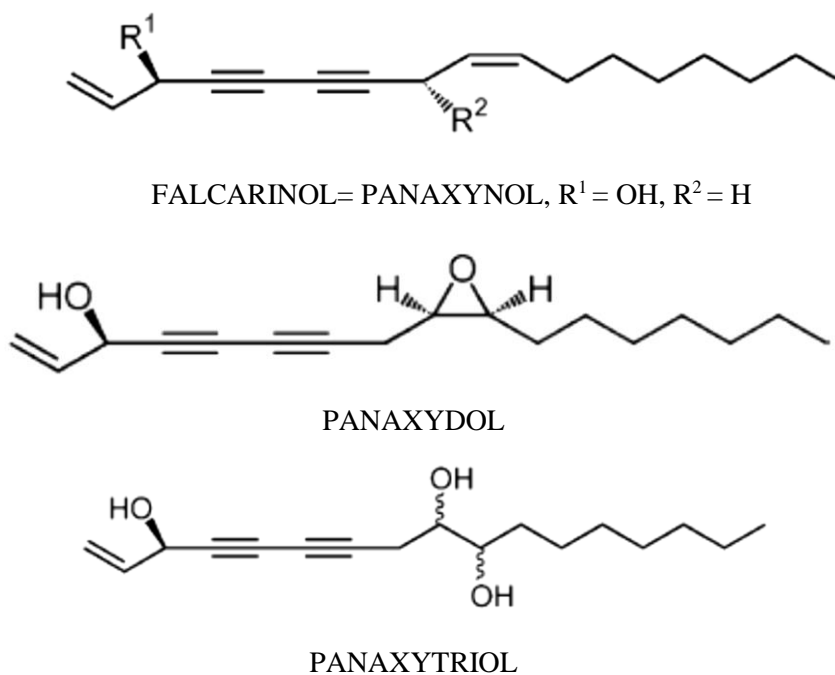
(TNF- α = tumor nekrotizující faktor α , IL-6 = interleukin-6, IL-8 = interleukin-8,
iNOS = indukovatelná syntasa oxidu dusnatého, TLR = toll-like receptor,
NF- κ B = nukleární faktor kappa B, IRAK-1 = kinyasy asociované s receptory interleukinu-1,
IKK = nukleární faktor, I κ B α = nukleární faktor)

2.3.2. POLYACETYLENY

Polyacetyleny byly izolovány z řady rostlin, hub, hmyzu, mořských řas a korálů. Jsou důležitými obsahovými látkami běžné zeleniny – např. mrkve (*Daucus carota*) a způsobují její hořkou chuť. Vykazují širokou škálu biologických účinků. Nacházejí se především v čeledích *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Annonaceae*, *Araliaceae*, *Meliaceae*, *Campanulaceae*, *Santalaceae*, *Toricelliaceae*, *Olacaceae* a *Zingiberaceae* (Negri, 2015).

2.3.2.1. Chemická struktura polyacetylenů

Polyacetyleny se vyznačují dvěma a více trojnými vazbami v molekule. Jsou to ve vodě nerozpustné a chemicky nestálé sloučeniny (Lee et al., 2015). Polyacetyleny jsou teplotně nestabilní a rovněž může dojít k jejich fotodekompozici, pokud se dostanou na denní světlo (Christensen et al., 2006). Struktura polyacetylenů ukazuje na biosyntézu z nenansycených mastných kyselin (Christensen et al., 2006).



Obr. 4: Chemická struktura polyacetylenů *Panax ginseng* (Christensen et al., 2006)

2.3.2.2. Obsah polyacetylenů v *Panax ginseng*

Distribuce polyacetylenů v rostlině závisí na rostlinné části, geografické poloze, vodním stresu, způsobu skladování, průmyslovém zpracování a datu sklizně (Negri,

2015). Množství polyacetylenů v *Panax ginseng* je poměrně vysoké. Panaxynol, falcarinol a panaxytriol byly v červeném ženšenu přítomny v koncentracích 250 µg/g, 297 µg/g a 320 µg/g (Kuklev et al., 2013).

2.3.2.3. Mechanismus účinků polyacetylenů

Polyacetyleny inhibují diacylglycerol-acyltransferasu (enzym, který katalyzuje tvorbu triglyceridů z diacylglycerolu a acyl-CoA) a acyl-CoA-cholesterolacyltransferasu (enzym katalyzující esterifikaci cholesterolu), což je potenciálním cílem pro farmakologickou intervenci hyperlipidémie a aterosklerotické onemocnění. Některé polyacetyleny vykazují antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigatus* (Negri, 2015).

2.4. FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY *PANAX GINSENG*

2.4.1. Efekt na centrální nervovou soustavu

2.4.1.1. Paměť a učení

Panax ginseng má na centrální nervovou soustavu jak stimulační, tak i inhibiční účinky, může ovlivňovat i neurotransmisi. Tento efekt mají především Rb₁ a Rg₁ ginsenosidy. Rb₁ ginsenosidy zvyšují příjem cholinu a usnadňují uvolňování acetylcholinu z hipokampu, a tak zlepšují učení a paměť a urychlují růst nervů (Attele et al., 1999). Proto *Panax ginseng* může zlepšit kognitivní funkce při Alzheimerově nemoci (Choi, 2008).

Ginsenosidy mohou ovlivňovat nervový přenos snížením dostupnosti neurotransmiterů. Na synaptosomech potkaního mozku bylo ukázáno, že výtažek z *Panax* v závislosti na koncentraci inhibuje vychytávání kyseliny gama-aminomáselné, glutamátu, dopaminu, noradrenalinu a serotoninu (Attele et al., 1999). Polyacetyleny vykazují inhibiční aktivitu na GABA receptory (Negri, 2015).

2.4.1.2. Neuroprotektce

Ginsenosidy mohou chránit nervy před ischemií. Byla prokázána ochrana hipokampálních nervů ginsenosidy Rb₁ před letálním ischemickým poškozením (Attele et al., 1999).

2.4.2. Efekt na kardiovaskulární systém

Panax ginseng normalizuje krevní tlak. Snižuje vysoký krevní tlak a zvyšuje tlak nízký. Má vasodilatační účinky, čímž zlepšuje cirkulaci krve. Nízké dávky ginsenosidů mohou mít antihypertenzivní účinek. (Choi, 2008).

Při pokusu s anestetizovanými psy bylo zjištěno, že při i. v. podání ethanolového nebo etherového extraktu *Panax ginseng* (40 mg/kg) se snížil celkový periferní odpor a způsobil vazodilataci a bradykardii, zatímco vodný roztok celkový periferní odpor zvýšil (Gillis, 1997).

2.4.3. Analgetický účinek

Panax ginseng inhibuje vápníkové kanály senzitivních neuronů, snižuje tedy vnímání bolesti (Choi, 2008).

2.4.4. Cytotoxicita a protinádorová aktivita

Ginsenosidy mohou mít přímé cytostatické účinky a inhibovat růst nádorových buněk, ostatní indukují diferenciaci a inhibici metastáz (Attele et al., 1999). Epidemiologické studie ukazují, že *Panax ginseng* působí preventivně proti rakovině. Především proti rakovině jater, žaludku a plic. *Panax ginseng* zvyšuje protinádorovou aktivitu protirakovinných léků a snižuje vedlejší účinky cytostatik (Choi, 2008). Antikarcinogenní účinek *Panax ginseng* je především díky ginsenosidům Rg₃ a Rh₂ (Sparg et al., 2014).

Z kořenů *Panax ginseng* bylo izolováno a identifikováno několik cytotoxických polyacetylenů, včetně falcarinolu, panaxydolu, panaxytriolu (Christensen et al., 2006). Panaxynol a panaxydol mají cytotoxický účinek na lidský adenokarcinom žaludku (Yang et al., 2008). Polyacetylen falcarinol má významný inhibiční účinek na vývoj preneoplastických lézí v tlustém střevu, a tedy možný antikarcinogenní efekt *in vivo* (Christensen et al., 2006).

2.4.5. Antidiabetický účinek

Hypoglykemický efekt *Panax ginseng* závisí na koncentraci jednotlivých ginsenosidů. Všechny nemají antidiabetický účinek (Christensen, 2009). *Panax ginseng* stimuluje sekreci insulínu. Ginsenosidy Rh₂ mají schopnost snížit hladinu glukózy v krvi (Choi, 2008). Ginsenosidy Rb₁ mají schopnost aktivovat jaderné receptor aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR), což je důležitý regulátor metabolismu lipidů (Christensen, 2009).

2.4.6. Protizánětlivý účinek

Ginsenosidy a jejich metabolity vykazují širokou škálu protizánětlivých účinků bez významných vedlejších účinků. Mezi mechanismy účinku patří například inhibice fosforylové kinasy a prozánětlivých cytokinů: interleukinu-6, interleukinu-8 a tumor nekrotizujícího faktoru- α (Shergis et al., 2014).

Kyselina oleanová a ginsenosidy od ní odvozené mají ze saponinů nejvyšší antikomplementární aktivitu (Sparg et al., 2004).

Podávání 100 mg/kg vodného extraktu korejského červeného ženšenu chrání hostitelské buňky před letální pneumokokovou sepsí. U předem ošetřených myší byla vyšší míra přežití, vyšší tělesná hmotnost, nižší počet bakterií a nižší hladina prozánětlivých cytokinů (Nguyen, 2015).

Protizánětlivý účinek polyacetylenů je pravděpodobně založen na inhibici enzymu 15- hydroxyprostaglandin-dehydrogenasa (Negri, 2015).

2.4.7. Antioxidační účinek a dlouhověkost

Panax ginseng chrání před oxidativním stresem tím, že zvyšuje produkci antioxidačních enzymů a snižuje produkci oxidantů (Shergis et al., 2014). Saponiny *Panax quinquefolius* mají přímé antioxidační vlastnosti. V nízkých koncentracích je jejich účinek vyšší v přítomnosti vitamínu C (Tůmová a kol., 2007). Dlouhodobé podávání korejského červeného ženšenu prodlužuje život testovaných zvířat. *Panax ginseng* zabraňuje zvýšení tvorby volných radikálů a peroxidaci lipidů (Choi, 2008).

2.4.8. Ostatní účinky

Panax ginseng vykazuje protistresový účinek. Studie na myších zjistily, že metabolity PPD jsou schopny inhibovat stresem zvýšenou hladinu kortizolu (Christensen, 2009). Interleukin-6 je také antistresový ukazatel, intraperitoneálně podané ginsenosidy tlumí jeho plazmaticky zvýšené hladiny (Christensen, 2009). Ginsenosidy Rb₁ mají antistresovou aktivitu. U myší zabraňují mozkové degeneraci způsobené stresem. (Choi, 2008).

Falcarinol je antagonist kanabinoidního receptoru CB1, který je zodpovědný za alergickou kožní reakci (Negri, 2015).

Panax ginseng zlepšuje funkci jater. Chrání játra před poškozením, podporuje jejich regeneraci a obnovu. Pomáhá při léčbě kocoviny. Působí proti hepatitidě. Podněcuje detoxikaci (Choi, 2008).

Některé složky *Panax ginseng* mohou inhibovat melanogenezi *in vivo* nebo *in vitro*. *Panax ginseng* tedy může být potenciálním kandidátem pro nové látky zesvětlující kůži (Kim, 2015). Melanogeneze je biochemická cesta odpovědná za syntézu melaninu, na jehož obsahu závisí zbarvení kůže.

Saponiny izolované z *Panax notoginseng* vykazují inhibiční vliv na motilitu zoospor *Aphanomyces cochlioides*. Tento účinek mělo 7 z 14 testovaných saponinů (Sparg et al., 2004).

Panax ginseng zlepšuje potíže spojené s klimakteriem u žen. Testy ukázaly 80% úspěšnost při podávání 3 g/den po dobu 2 měsíců (Choi, 2008).

Panax ginseng může pomoci při sexuálních dysfunkcích mužů. Pomáhá především u potíží způsobených stresem. Zlepšuje erekci, sexuální touhy a uspokojení. Nicméně, ginsenosidy Rb₁ nemají významný vliv na zvýšení páření u myších samců (Choi, 2008).

Byla pozorována účinnost inhibice růstu viru HIV u surových saponinových komponent korejského červeného ženšenu (Choi, 2008).

Panax ginseng lze využít při odvykání kouření. Dle studie prováděné na myších, ženšenové saponiny mohou být vhodné pro prevenci a terapii některých nežádoucích účinků nikotinu (Sparg et al., 2004).

Panax ginseng zvyšuje účinnost očkování proti chřipce (Hu et al., 2005).

2.5. INTERAKCE S LÉČIVY

2.5.1. Interakce s warfarinem, heparinem a aspirinem

Warfarin se používá jako antikoagulační činidlo. Jde o racemickou směs S- a R- enantiomerů. Metabolizace probíhá pomocí jaterního cytochromu P450 (CYP). R- warfarin je metabolizován především CYP1A2 na 6- hydroxywarfarin a 8- hydroxywarfarin a CYP3A4 na 10- hydroxywarfarin. S- warfarin pomocí CYP2C9 na 7- hydroxywarfarin. Potenciálně tedy může vzniknout léková interakce s léky metabolizovanými těmito CYP (Shao et al., 2013).

Extrakty *Panax ginseng* vykazují inhibiční aktivitu na CYP. U morčat byla prokázána silná inhibice CYP1A. V jedné studii ginsenosid Rd slabě inhiboval aktivitu CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19 a CYP2C9, zatímco ginsenosid Rc stimuloval činnosti CYP2C9 o 70 % a ginsenosid Rf zvýšil aktivitu CYP3A4 o 54 % (Fasinu et al., 2016). Ginsenosidy působí *in vitro* jako antiagregancia. Inhibice krevních destiček může být ireverzibilní. Přesný mechanismus interakce warfarinu s *Panax ginseng* není známý (Tůmová a kol., 2007).

Studie na potkanech ukázala, že současné podávání *Panax ginseng* s warfarinem nijak výrazně nezmění farmakokinetické parametry a protrombinový čas warfarinu. V této studii bylo po dobu 5 dnů orálně podáváno 0,2 mg/kg/den warfarinu a 2 g/kg/2 × denně ženšenového odvaru (Shao et al., 2013).

Studie na lidech s ischemickou cévní mozkovou příhodou ukázala mírný pokles hodnot International Normalized Ratio (INR = poměr protrombinového času pacienta a času normálního vzorku) při podávání *Panax ginseng* a warfarinu současně ve srovnání placebo s warfarinem. Tento rozdíl nebyl ale statisticky významný (Shao et al., 2013). 1 g amerického ženšenu denně ale snižuje antikoagulační účinek a plazmatické hladiny warfarinu u zdravých dobrovolníků (Shao et al., 2013). V otevřené zkřížené randomizované studii na 12 zdravých mužích *Panax ginseng* neměl vliv na farmakodynamiku warfarinu (Meyler's, 2016).

Přesto je vhodné vyhnout se současnému užívání *Panax ginseng* s warfarinem, heparinem, kyselinou acetylsalicylovou a nesteroidními antiflogistiky (Tůmová a kol., 2007).

2.5.2. Interakce s ostatními léčivy a alkoholem

Ginsenosidy ovlivňují sekreci kortikoidů a mají inhibiční vliv na fosfodiesterasu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), mohou potencovat toxický efekt kortikoidů (Tůmová a kol., 2007).

Při současném podávání fenelzinu s *Panax ginseng* byla popsána bolest hlavy, třes, manické psychózy, nespavost, podrážděnost. Pacienti trpící maniodepresivními poruchami a psychózami by neměli užívat *Panax ginseng* (Tůmová a kol., 2007). Žena s předchozími epizodami deprese prodělala maniakální epizodu několik dní poté, co *Panax ginseng* začala užívat (Meyler's, 2016).

Panax ginseng má potenciál jako chemoterapeutické adjuvans. *In vitro* i *in vivo* studie na zvířatech ukazují zvýšený protinádorový efekt, pokud je *Panax ginseng* podáván v kombinaci s některými léky proti rakovině. Neexistuje ale zatím dostatečné množství klinických studií, které by tento efekt *Panax ginseng* potvrdilo (Chen et al., 2014).

Panax ginseng zvyšuje clearance alkoholu v krvi (Tůmová a kol., 2007).

Tab. 3: Lékové interakce *Panax ginseng* (Tůmová a kol., 2007)

Příklady zaznamenaných interakcí mezi <i>Ginseng radix</i> a ostatními léčivy		
léčivá rostlina/ droga	Léčivo	výsledky interakce
<i>Ginseng radix</i>	chemoterapeutika	zvýšení účinku
	warfarin	zvýšené riziko krvácení
	SSRI	
	cyklosporin	zvýšení sérové koncentrace
	digoxin	
	cisplatina	zmírnění emise způsobené cisplatinou, zvýšení antiproliferačního účinku
	imunosupresiva	snížení účinnosti
	antidiabetika	zvýšení účinku
	fenelzin	bolest hlavy, mánie, tremor
	alkohol	zvýšení clearance alkoholu

2.6. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY

Panax ginseng je obecně bezpečný. Při vysokých dávkách může způsobit nespavost, bolesti hlavy, průjem, kardiovaskulární a endokrinní poruchy (Meyler's, 2016). Nejčastější nežádoucí účinky vyplývající z jeho předávkování jsou nervozita a popudlivost (Hong et al., 2015).

Po užívání 2 tablet po 3 dnech (není specifikováno množství *Panax ginseng* v mg), se jako nežádoucí účinek *Panax ginseng* objevila hypertenze, nespavost, bolest hlavy a krvácení z nosu. U 72 leté pacientky způsobila estrogenní aktivita *Panax ginseng* při jeho dlouhodobém užívání vaginální krvácení (Tůmová a kol., 2007).

Při chronickém podávání u potkana, myši, psa a králíka bylo pozorováno velmi málo nežádoucích účinků. Při denní dávce 15 mg/kg po dobu 90 dnů (podáváno psovi) nebyly žádné změny související s léčbou v tělesné hmotnosti, hematologii ani klinické chemii. Ve dvouleté studii, 14 ze 133 subjektů hlásilo nervozitu, nespavost a gastrointestinální poruchy spojené s prodlouženou spotřebou dávek (až do 15 g/den), které byly mnohem vyšší, než je doporučeno (Gillis, 1997).

Databáze WHO obsahuje sedm případů z pěti zemí, kde pravidelný příjem ženšenu následovala arteriální hypertenze. U pěti z nich nebyla zaznamenána žádná jiná medikace (Meyler's, 2016).

Světová zdravotnická organizace dospěla k závěru, že při dodržení doporučených dávek nejsou pravděpodobně žádné vedlejší účinky ženšenu (Gillis, 1997).

2.7. PĚSTOVÁNÍ *PANAX GINSENG IN VITRO*

Polní pěstování *Panax ginseng* je časově náročný a pracný proces. Trvá 5 – 7 let. Při využití kultur rostlinných buněk je produkce rychlejší a kvalitativně i kvantitativně kontrolovanější (Wu et al., 1999).

Alternativním způsobem pěstování adventivních kořenů *Panax ginseng* v bioreaktoru lze získat celý rozsah ginsenosidů, který získáme z rostlin pěstovaných klasickým způsobem. Ginsenosidy byly izolovány z adventivních kořenů kultivovaných v tekutém Schenk-Hildebrandtově (SH) médiu doplněném o 24,6 μM kyseliny idoly-3- máselné, 3 % sacharosy a 0,1 % *myo*-Inositolu. Adventivní kořeny byly kultivovány v 500 cm³ Erlenmayerových baňkách v rotační třepačce při 125 otáčkách za minutu. Kultivace probíhala při 24 ± 1 °C ve tmě. Adventivní kořeny byly přesazovány každé čtyři týdny. Kořeny produkované *in vitro* jsou „skutečné“ kořeny. Mohou být použity pro přípravu extraktu i jako přírodní kořenový materiál (Langhansová et al., 2012).

Pěstování adventivních kořenů *in vitro* není příliš nákladné. Při využití bioreaktorů jde o produkci bez pesticidů a bez ničení životního prostředí (Sivakumar et al., 2005).

2.7.1. Produkce sekundárních metabolitů

Kvalita rostlin určených pro zpracování ve farmaceutickém průmyslu bývá posuzována na základě obsahu sekundárních metabolitů. Jejich obsah se může výrazně lišit v závislosti na počasí, růstových podmínkách a poškození patogeny a škůdci. Těmto komplikacím se dá předejít převedením rostlin do izolovaných podmínek hydroponického pěstování, do kultivačních médií (Kuzel et al., 2009). Dalším způsobem, jak těmto komplikacím předejít, je *in vitro* kultivace.

Sekundární metabolity rostlin jsou jedinečnými zdroji pro léčiva, potravinová aditiva a příchutě a další průmyslové materiály. Hromadí se často v rostlinách vystavených stresu, například v podobě elicitoru, signálních molekul nebo abiotického stresu (Zhao et al., 2005). Elicitace rostlin pěstovaných v půdě je problematická (Kuzel et al., 2009).

Sekundární metabolity můžeme získat přímou extrakcí z rostlin a chemickou syntézou nebo z buněčných kultur rostlin (Zhao et al., 2005).

2.7.2. Složení živného média a kultivační podmínky

2.7.2.1. Nádoba

Produkcí sekundárních metabolitů ovlivňuje geometrie kultivační nádoby a způsob provzdušňování, na kterém závisí přenos kyslíku a živin. Nehomogenní systémy způsobí buněčnou sedimentaci a smrt (Langhansová et al., 2005).

2.7.2.2. pH

Mírnější změny pH média nemají významný vliv na růst kořenů, ale ovlivňují obsah saponinů v nich. Maximum (0,26 %) saponinů bylo získáno při pH 6,0. Obsah saponinů u kořenů pěstovaných při pH 6,0 – 7,0 byl vyšší než u těch, které rostly při pH 5,0 – 5,5 (Kim et al., 2005).

2.7.2.3. Teplota a světlo

Optimální teplota pro buňky *Panax ginseng* je v rozmezí 24 – 28 °C. Při nižších teplotách je růst příliš pomalý, při vyšších zcela inhibuje. Světlo významně neovlivňuje produkci saponinů (Wu et al., 1999).

Polyacetyleny na denním světle podléhají fotodekompozici (Christensen et al., 2006).

2.7.2.4. Sacharosa

Sacharosa je hlavní zdroj energie. Tempo růstu biomasy je v přímé korelaci se spotřebou sacharosy. Nejvýhodnější koncentrace sacharosy v médiu je 30 g/l (3% roztok) (Kim et al., 2005). Bylo prokázáno, že sacharosa sterilizovaná v autoklávu je pro růst lepší než ta sterilizovaná pomocí filtrace. Autoklávování hydrolyzuje sacharózu na efektivněji využitelné cukry (Saad et al., 2012).

2.7.2.5. Dusík a fosfor

Oxid dusnatý je zapojen do produkce sekundárních metabolitů (Zhao et al., 2005). Nejvhodnější koncentrace dusíku je 382,7 mg/l. Příliš vysoká koncentrace by mohla nepříznivě ovlivnit růst buněk i biosyntézu saponinů (Kim et al., 2005).

Fosfor je klíčová živina pro buněčný růst a tvorbu sekundárních metabolitů. Nemá významný vliv na hmotnost čerstviny. Počáteční zvýšená koncentrace fosfátu (26,9 – 40,40 mg/l) nejprve obsah saponinů zvýší, poté výrazně sníží (Kim et al., 2005).

2.7.2.6. Vitamíny a inositol

Vitamíny fungují jako katalyzátory různých metabolických procesů, některé jsou nutné pro normální růst a vývoj rostliny. Thiamin je nezbytně nutný pro růst všech buněk (Saad, Elshahed, 2012).

Inositol už v malých množstvích stimuluje růst buněk (Saad, Elshahed, 2012).

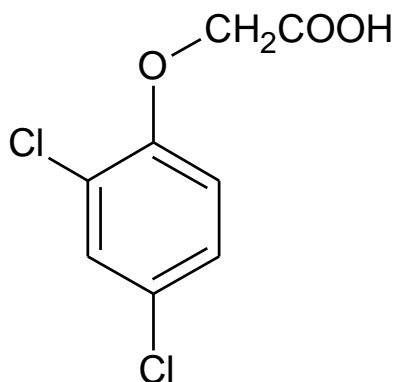
2.7.2.7. Auxiny

Auxiny jsou fytohormony. Působí v rostlinách ve velmi nízkých koncentracích vazbou na specifické receptory v lipidové dvojvrstvě buněčné membrány. Jsou důležité pro správný vývoj rostlin (Flasiński et al., 2015). Auxiny jsou nezbytné pro životní cyklus rostliny. Podílejí se na buněčném dělení a diferenciaci, ovlivňují tvorbu a růst kořenů, listů, květů, pupenů i plodů (Flasiński et al., 2014).

Druh a koncentrace auxinu ovlivňuje kvalitu kořenů. Při kombinaci cytokininů s auxinem dochází ke zvýšení růstu biomasy (Langhansová et al., 2012).

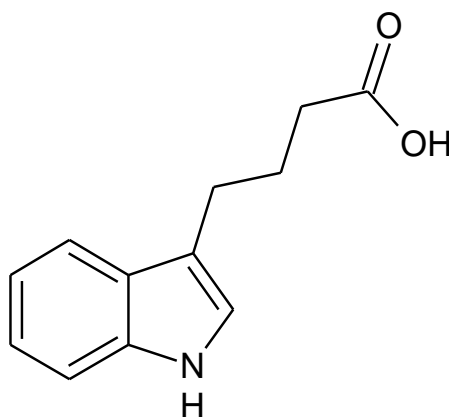
Dle struktury rozlišujeme tři hlavní skupiny auxinů: deriváty kyseliny octové, deriváty chlorované kyseliny fenoxycetové a deriváty kyseliny naftylacetové (Flasiński et al., 2015).

Jako derivát chlorované fenoxycetové kyseliny je nejznámější a nejpoužívanější kyselina 2, 4- dichlorfenoxycetová (2,4- D). 2,4- D podporuje více buněčné dělení a diferenciaci než organogenezi (Langhansová et al., 2012). Nejvhodnější koncentrace pro růst kalusů je 1 – 5 mg/l. Mnohem nižší koncentrace jsou ale vhodné pro syntézu saponinů (např. 0,1 mg/l) (Wu et al., 1999). V zemědělství se používá jako herbicid (Flasiński et al., 2015).



Obr. 5: Chemická struktura 2,4- D (Saad, Elshahed, 2012)

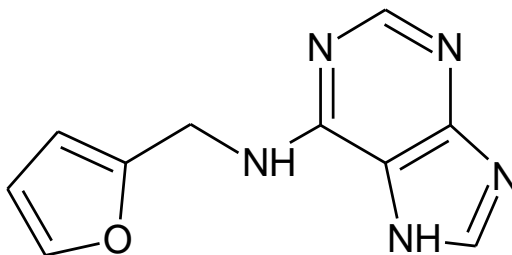
Indol-3-octová kyselina (IAA) je přirozeně se vyskytující auxin. Jde o derivát kyseliny octové. Reguluje embryogenezi, apikální dominanci a protažení stonku. (Flasiński et al., 2015). Její blízký chemický derivát je kyselina indolyl-3-máselná (IBA), která stimuluje kořenovou diferenciaci (Langhansová et al., 2012). IBA je endogenním prekurzorem IAA (Růžička et al., 2010). Přítomnost této kyseliny silně snižuje kořenové násobení, ale úplně nepotlačuje kořenovou indukci (Langhansová et al., 2012).



Obr. 6: Chemická struktura IBA (Saad, Elshahed, 2012)

2.7.2.8. Kinetin

Kinetin je rostlinný hormon patřící mezi cytokininy (deriváty adeninu). Byl objeven jako degradační produkt DNA, který podporuje buněčné dělení u rostlin. Ovlivňuje růst i vývoj rostlin. Působí jako antioxidant *in vivo* i *in vitro* (Barciszewski et al., 2007). Kinetin je důležitý pro zvýšení počtu kořenů a pro indukci růstu kalusů (Langhansová et al., 2012).



Obr. 7: Chemická struktura kinetinu (Chemsynthesis, 2016)

2.7.3. Elicitace kultur *Panax ginseng in vitro*

Elicitace spočívá v umělém vyvolání biochemické odpovědi rostliny na abiotický stres, nebo jde o reakci rostliny na napadení patogeny. Obranné mechanismy rostlinné buňky jsou aktivovány po poznání molekuly elicitoru na povrchu plazmatické membrány (Rahimi et al., 2014).

Elicitory jsou chemikálie z různých zdrojů, které mohou vyvolat fyziologické i morfologické odpovědi a akumulaci fytoalexinů (Zhao et al., 2005). Obecně je rozdělujeme na biotické a abiotické elicitory. Abiotické, pocházející z neživých zdrojů, můžeme rozdělit na hormonální (kyselina jasmonová, kyselina salicylová), chemické (těžké kovy) a fyzikální (teplota, salinita). Biotické elicitory aktivují indukovatelnou obrannou reakci, stimuluji příznivé změny v rostlinách. Mezi biotické řadíme koronatin a chitosan (Gorelick et al., 2014).

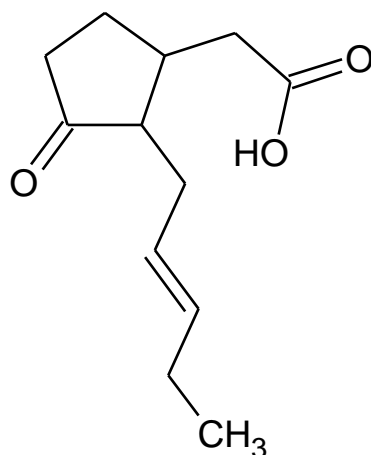
2.7.3.1. Jasmonová kyselina a její deriváty

Kyselina jasmonová (JA) je fytohormon regulující biosyntézu sekundárních metabolitů v *Panax ginseng* (Rahimi et al., 2014). Prekursorem JA je kyselina α -linolenová (Gundlach et al., 1992). JA byla odvozena působením lipoxygenasy (Rahimi et al., 2014). Poprvé byla izolována z kultur houby *Lasiodiplodia theobromae* (Creelman, 1995). Bylo prokázáno, že JA a její methylester jsou přírodní regulátory rostlinné senescence. JA je nedílnou součástí systému signální transdukce, který reguluje indukovatelné obranné geny v rostlinách (Gundlach et al., 1992). Změny v genové expresi v rostlinách jsou indukované nanomolární až mikromolární koncentrací JA/methylesteru kyseliny jasmonové (MJ) (Creelman, 1995).

Exogenní aplikace signálních sloučenin JA a jejich příbuzných látek stimuluje biosyntézu sekundárních metabolitů (Zhao et al., 2005). Dochází ke zvýšení produkce řady sekundárních metabolitů včetně flavonoidů, terpenoidů a alkaloidů (Gorelick et al., 2014). Zvýšení koncentrace JA vede k vyššímu obsahu ginsenosidů v adventivních kořenech, ale zároveň výrazně inhibuje jejich růst. Čerstvá hmotnost, hmotnost sušiny i poměr růstu kořenů se snižují se zvyšující se koncentrací JA. JA podporuje spíše syntézu PPD než PPT (Yu et al., 2002).

Při biosyntéze ginsenosidů, skvalenepoxidasa konvertuje skvalen na 2,3- oxidoskvalen, který je substrátem pro syntézu PPD. PPD se potom převede na PPT pomocí cytochromu P450. MJ neovlivňuje skvalenepoxidasu (Wang et al., 2013).

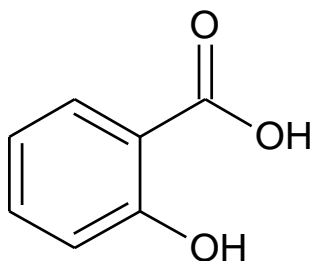
MJ zvyšuje množství ginsenosidů. MJ indukuje změny triterpenických saponinů a expresi genů účastnících se jejich biosyntézy. Nejvyšší obsah saponinů byl získán při koncentraci MJ 10 mg/l po dobu 24 hodin. Byl $4,76 \times$ větší než u kontrolní skupiny (Wang et al., 2013).



Obr. 8: Chemická struktura JA (Gundlach et al., 1992)

2.7.3.2. Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA) je signalizační elicitor. Její molekula je aktivována při interakci rostliny s patogenem. Je produkována v místě lokalizace infekce a šíří se systémově celou rostlinou. Indukuje hromadění patogenních sloučenin. Stimuluje biosyntézu JA. Dle studie mělo ošetření SA významný negativní dopad na čerstvou hmotnost adventivních kořenů (Rahimi et al., 2014). SA stimuluje produkci sekundárních metabolitů, například produkci alkaloidů v barvínku (vinkristin, vinblastin) a glycyrrhizinů v lékořici (Gorelick et al., 2014).



Obr. 9: Chemická struktura SA (Medaprex, 2015)

2.7.3.3. Kvasničný extrakt

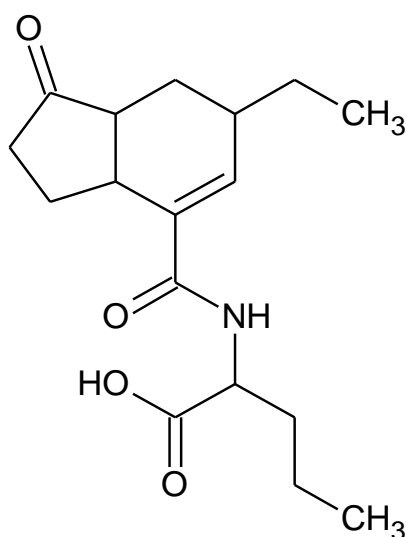
Kvasničný extrakt (YE) je biotický elicitor (Rahimi et al., 2014). YE je směs aminokyselin, peptidů, ve vodě rozpustných vitaminů a sacharidů (Sigma-Aldrich). Obsahuje komplex vitaminů B včetně riboflavinu, pyridoxinu a thiaminu, které ovlivňují růst (Imran et al., 2016).

2.7.3.4. Kasein hydrolyzát

Kasein hydrolyzát (CH) je hlavní bílkovinná složka mléka. CH je zdrojem aminokyselin. Patří do skupiny fosfoproteinů (Wang et al., 2013). CH má antioxidační aktivitu, která na rozdíl od kaseinu, není díky degradaci peptidů během trávení v gastrointestinálním traktu značně snížena (Wang et al., 2016). Enzymatickou hydrolyzou se zvýší funkční vlastnosti proteinové struktury (Wang et al., 2013).

2.7.3.5. Koronatin

Koronatin (COR) je patogenní toxin produkovaný rostlinnou bakterií *Pseudomonas syringae*. Má potenciál působit jako regulátor růstu rostlin a spouštěč sekundárního metabolismu. COR indukuje biosyntézu JA. Je to strukturální a funkční analog JA (Onrubia et al., 2013). COR má řadu biologických funkcí, včetně inhibice prodloužení kořenů (Cusido et al., 2014).



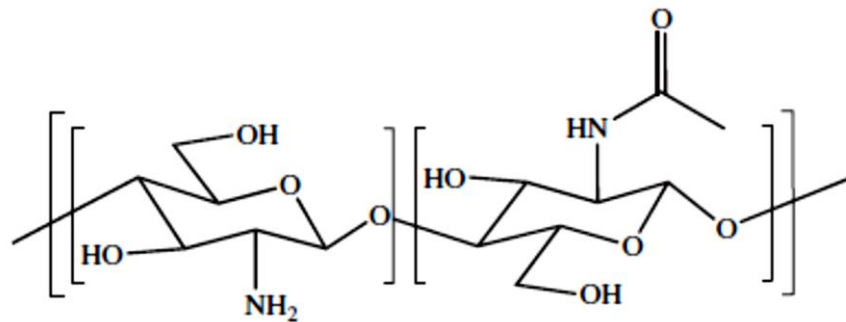
Obr. 10: Chemická struktura COR (Budde, 1999)

2.7.3.6. Chitosan

Chitosan (CHIT) je biopolymer odvozený částečnou deacetylací z přírodního polymeru chitinu. Chitin je hlavní složkou buněčných stěn některých druhů hub a napodobuje účinky patogenních mikroorganismů ke stimulaci rostliny syntetizovat sekundární metabolity (Wiktorowska et al., 2010).

CHIT je lineární, semikrystalický polysacharid složený z (1→4) -2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukanových (N-acetyl D-glukosaminu) a (1→4) -2-amino-2-deoxy-β-D-glukanových (D-glukosaminu) jednotek (Croisier et al., 2013).

Vyazuje biokompatibilitu a biologickou rozložitelnost díky přítomnosti primárních aminů. Biologický rozklad CHIT vede k tvorbě netoxických oligosacharidů proměnné délky. Ty mohou být začleněny do metabolických drah (Croisier et al., 2013). CHIT má mukoadhezivní vlastnosti, hemostatickou a antimikrobiální aktivitu. Může komunikovat s negativní částí buněčné membrány, což může vést k reorganizaci a otevření těsného spojení bílkovin (Croisier et al., 2013).



Obr 11: Chemická struktura CHIT (Croisier et al., 2013)

3. Cíl diplomové práce

Cílem této práce bylo:

1. sledovat vliv elicitorů na produkci ginsenosidů a polyacetylenů v kořenových kulturách *Panax ginseng*
2. vybrat optimální elicitor a stanovit jeho optimální koncentrace pro produkci ginsenosidů a polyacetylenů v kořenových kulturách *Panax ginseng*
3. sledovat schopnost elicitovaných kořenových kultur *Panax ginseng* inhibovat cyklooxygenasu 2
4. sledovat schopnost elicitovaných kořenových kultur *Panax ginseng* inhibovat proliferaci nádorových buněk

4. Experimentální část

4.1. MATERIÁL, POMŮCKY, PŘÍSTROJE

4.1.1. Biologický materiál

Panax ginseng - ÚEB AV ČR

Buněčné linie lidského tlustého střeva - zakoupeny v ATCC

4.1.2. Pomůcky a přístroje

4.1.2.1. Pomůcky:

Alobal, automatické pipety SOCOREX Acura a špičky, Erlenmayerovy baňky, sterilní plastové nádoby 15 ml a 50 ml, kádinky, kolonky HLB 6cc OASIS, kopistky, lžičky, magnetická míchadla, mikrozukmavky Eppendorf SAFE LOCK 1,5 ml PCR clean, nůžky, odměrné válce, odparné baňky, pinzety, plastové mikrozukmavky NUNC InterMed, skleněné zkumavky KIMAX a PYREX se šroubovacím uzávěrem, stojánky, třecí miska s tloučkem, skleněné nádoby

4.1.2.2. Přístroje:

Analytické váhy OHAUS Adventurer Pro AV 413C, d = 0,001 g

Analytické váhy OHAUS AS 200, d = 0,1 mg

Box s laminárním prouděním HOLTEN LaminA

Centrifuga HETTICH zentrifugen MIKRO 20

Centrifuga HETTICH zentrifugen UNIVERSAL 32 R

Elektrické váhy OHAUS Scout Pro SPU 402, d = 0,01 mg

Elektroda pH- Electrode Sentix 41 WTW

Hmotnostní spektrometr Q-Trap 4000 AB SCIEX

Kolona Acclaim RSLC C18 DIONEX, 2,1 × 50 mm, 2,2 μm

Kolona Kinetex C18 DIONEX, 2,6 × 150 mm, 2,1 μm

Lyofilizátor LABCONCO FreeZone 2.5

Magnetická míchačka IKA BIG SQUID

Míchadlo s plotnou IKA Labortechnik RCT Basic

Odparka s dusíkem EVATERM

Parní autokláv Systec DB-23

PGE2 ELISA kit
Ph-metr pH 3210 WTW
Rotátor Labnet International Inc.
Spektrofotometr Tecan Infinite M200
Suchý termostat EVATERM 14
Třepačka GALLENKAMP
Třepačka SANYO orbital incubator
Ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX
UPLC systém Ultimate 3000 DIONEX
Vakuová odparka BÜCHI Rotavapor R-114
Zařízení na přípravu čisté vody SCI-AQUA HPLC UV

4.1.3. Chemikálie

Zdroj: Sigma-Aldrich

Stupeň čistoty: p. a.

1% penicilin/streptomycin

Acetonitril

CaCl₂×2H₂O

Casein hydrolyzát

CoCl₂×6H₂O

CuSO₄×5H₂O

Deionizovaná voda pro HPLC

DMEM médium

DMSO

Dusičnan draselný

Ethylacetát

FBS

FeSO₄×7H₂O

Formaldehyd

Hematin porcine (vepřový hematin)

Hydroxid sodný

Ibuprofen

Jodid draselný

Kinetin
Koronatin
Kvasničný extrakt
Kyselina 2,4- dichlorfenoxyoctová
Kyselina 3- indolylmáselná
Kyselina arachidonová
Kyselina boritá
Kyselina chlorovodíková
Kyselina jasmonová
Kyselina mravenčí
Kyselina nikotinová
Kyselina octová
Kyselina salicylová
L- epinefrin
Methanol
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Myo-Inositol
 Na_2EDTA
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
Neutrální červeň (5, 3- amino- 7- dimethylamino- 2- methylfenazin hydrochlorid)
 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
PBS
Pyridoxin- hydrochlorid
Sacharosa
Thiamin- hydrochlorid
Tris pufr (tris(hydroxymethyl)aminometanu, pH 8,0)
 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

4.2. METODIKA PRÁCE

4.2.1. Příprava experimentu

Veškeré pomůcky a média byla předem vždy vysterilizována v autoklávu, veškerá práce probíhala v aseptickém prostředí laminárního boxu.

Kořenové kultury *Panax ginseng* byly rozváženy do Erlenmayerových baněk, zality 100 ml SHIK médiem a uzavřeny alobalem. Na tři týdny byly přesunuty do třepacího boxu. Zde byly ve tmě a při stálé teplotě 24 ± 1 °C. Po 20 dnech bylo vyměněno médium.

O další týden později byly vzorky elicitovány.

4.2.2. Elicitace

Elicitace proběhla v aseptických podmínkách laminárního boxu a za využití sterilní membránové filtrace. Koncentrace jednotlivých použitých elicitorů uvádí následující tabulka.

Tab. 4: Koncentrace použitých elicitorů

CHIT	AgNO ₃	SA	YE	COR	CH	JA
25 mg/l	0,5 μM	50 μM	0,5 g/l	0,001 μM	0,5 g/l	5 mg/l
50 mg/l	1 μM	100 μM	1 g/l	0,01 μM		
75 mg/l	2,5 μM	200 μM	5 g/l	0,1 μM		
100 mg/l	5 μM		10 g/l	1 μM		
150 mg/l	10 μM			10 μM		
	25 μM					
	50 μM					
	100 μM					

4.2.3. Sklizeň kořenů

Čtrnáct dní po elicitaci proběhla sklizeň. Kořeny byly odebrány do sterilních plastových nádobek. Následovalo jejich zamražení při -80 °C. Poté byly vzorky 24 hodin lyofilizovány.

4.2.4. Příprava vzorků k analýze ginsenosidů

4.2.4.1. Extrakce ginsenosidů

Pro extrakci ginsenosidů byla provedena homogenizace sušiny ve třecí misce. Bylo odebráno 0,3 g suché hmoty do sterilních nádobek a zalito 30 ml methanolu, 1 minutu sonikováno a extrahováno přes noc (18 hodin). Následovala 20 minut centrifugace při 4000 rpm, 24 °C. Supernatant byl slit do předvážených odparných baněk. Dále probíhala extrakce po dobu 1 hodiny v 15 ml methanolu a opět následovala centrifugace po 20 minut při 24 °C a 4000 rpm. Supernatant byl slit.

Methanolvý extrakt byl do sucha odpařen na vakuové odparce.

4.2.4.2. Separace ginsenosidů

Odparek byl postupně rozpuštěn v deionizované vodě a následně byl zcentrifugován při 4000 rpm při 24 °C po dobu 20 minut. Celkem 7 ml supernatantu bylo nalito na nasorbovanou kolonku HLB 6cc Oasis. Filtrát byl nakonec ve zkumavkách odpařen pod proudem dusíku.

4.2.4.3. Sorpce na kolonkách HLB 6cc Oasis

Kolonky bylo třeba nejdříve naplnit 5 ml methanolu a následně propláchnout 20 ml čištěné vody. Až poté bylo možno nalít vzorky. Ze vzorků byly následně vymyty cukry pomocí 10 ml čištěné vody. Nakonec byly postupně vymyty sorbované ginsenosidy pomocí methanolu do zkumavek.

Pro recyklaci byly kolonky propláchnuty 10 ml methanolu a vysušeny. Recyklace proběhla 3×.

4.2.5. UPLC analýza ginsenosidů

Veškerou UPLC analýzu provedl Mgr. Petr Maršík, PhD.

Pro chromatografickou separaci na UPLC systému byly vzorky rozpuštěny v 1 ml methanolu, 20 minut centrifugovány při 12000 rpm a slity do skleněných nádobek.

Byla použita kolona s reverzní fází Kinetex C18 a gradientová eluce v systému voda: acetonitril s přídavkem 0,25 % kyseliny mravenčí. Kvantitativní stanovení ginsenosidů bylo provedeno na hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem. Při LC/MS/MS analýze bylo využito kombinace „time scheduled MRM“ umožňující různé

nastavení parametrů hmotnostního spektrometru během analýzy a detekce v pozitivním i negativním módu dle odezvy pro ginsenosidy.

4.2.6. **Extrakce k analýze polyacetylenů**

Pro extrakci polyacetylenů byla provedena homogenizace sušiny ve třecí misce. Bylo naváženo 0,1 g homogenizované sušiny do skleněné sterilní zkumavky. Sušina byly extrahována ve tmě na kolotoči přes noc (18 hodin) v 5 ml ethylacetátu. Poté proběhla centrifugace při 20 °C při 4000 rpm po dobu 20 minut. Supernatant byl slit. Následovala druhá extrakce ve 2 ml ethylacetátu po dobu 60 minut ve tmě a poté byly vzorky zcentrifugovány za stejných podmínek.

K ethylacetátovému extraktu bylo přidáno 6 ml čištěné vody, 10 krát bylo důkladně protřepáno až do vzniku „emulze“. Vzorky byly zcentrifugovány za již zavedených podmínek. Ethylacetátová frakce byla sebrána a vysušena při 35 °C pod proudem dusíku.

4.2.7. **UPLC analýza polyacetylenů**

Polyacetyleny byly stanovovány pomocí UPLC s PDA (fotodioda Array) detekcí na stejné sestavě, která byla použita pro stanovení ginsenosidů. Pro analýzu byly vzorky rozpuštěny v 500 µl methanolu, 10 minut centrifugovány při 14000 rpm a supernatant přendán do skleněných nádobek.

Byla použita kolona Acclaim a mobilní fáze methanol: voda (od počátečních 10 % po 100 % methanolu v 15. minutě). Pro potvrzení jejich identity byl použit hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (Q-Exactive) typu Orbitrap (Thermo) a dvourozměrná plynová chromatografie (GC × GC) s hmotnostním detektorem (Pegasus 2, Leco) a komerční databází (NIST).

Rutinní semikvantitativní analýza polyacetylenů byla provedena výše zmíněnou absorpční spektrometrií (PDA), jejíž citlivost je vzhledem k charakteristickým spektrům polyacetylenů s výraznými maximy okolo 252 nm, 266 nm a 281 nm a výborné absorpci v ultrafialové oblasti srovnatelná či dokonce vyšší než alternativní stanovení pomocí LC/MS.

4.2.8. Příprava vzorků na testování biologické aktivity

Dle výsledků z analýzy polyacetylenů byly vybrány ty elicitory, které vyvolávaly zvýšení jejich produkce. Poté byla napěstována kořenová biomasa *Panax ginseng* v 500 ml SHIK médiu v Erlenmayerových baňkách, ve tmě na třepacím boxu při 24 °C po dobu 8 týdnů. Elicitace jednotlivých vzorků proběhla 4. týden současně s výměnou média. Jako elicitory byly použity COR 0,1 µM, CHIT 150 mg/l, YE 5 g/l a JA 5 mg/l.

Extrakce viz kapitola 4.2.6.

4.2.9. Test biologické aktivity

4.2.9.1. Cytotoxické působení na nádorové buňky

Buněčné linie (SW480 a SW620) odvozené z lidského kolorektálního karcinomu byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle's médiu (DMEM) doplněném 10 % teplem inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % penicilin/streptomycinem. Kultivace probíhala v T-75 cm² sterilních lahvích umístěných v inkubátoru ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % CO₂ při 37 °C.

Pro testování antiproliferačního účinku byly buňky kultivovány v 96- jamkových destičkách. Po 48- hodinové a 72- hodinové expozici bylo vyměněno médium a přidáno 100 µl média neutrální červení. Po dobu 3 hodin probíhala inkubace při 37 °C. Poté byly buňky promyty 100 µl fosfátového pufru (PBS) a 15 minut fixovány v roztoku 0,5% formaldehydu/1% CaCl₂. Následovala inkubace s lyzačním roztokem (50% EtOH/1% CH₃COOH) za třepání po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Absorbance rozpuštěného barviva byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Každý vzorek byl testován v 6 paralelkách.

4.2.9.2. Inhibice COX-2

Inhibiční aktivita COX-2 byla stanovena pomocí enzymatického testu v souladu s již dříve publikovanou metodou (Reininger, Bauer, 2006). Inkubační směs obsahovala 100 mM Tris pufru (pH 8,0), 18 mM L-epinefrinu, 5 µM vepřového hematinu a 50 µM Na₂EDTA. Na 180 µl inkubační směsi byly přidány 0,2 jednotky COX-2 na každou reakci. Testované vzorky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), proto DMSO bylo použito jako negativní kontrola a ibuprofen byl použit jako pozitivní kontrola.

Reakční směs byla inkubována v 96- jamkových mikrotitračních destičkách. Reakce byla zahájena 10 μ M kyseliny arachidonové. Zastavena byla 10% kyselinou mravenčí po 20 minutách inkubace při 37 °C. Koncentrace vytvořeného PGE₂ byla stanovena pomocí PGE₂ ELISA kitu. Vzorke byly zředěny 1 : 15 v testovacím pufru a dále se postupovalo podle návodu výrobce. Absorbance byla měřena při 405 nm. Jako referenční inhibitor byl použit ibuprofen. Inhibiční koncentrace (IC₅₀) byla spočtena ze čtyř koncentrací. Test byl opakován třikrát, v každém testu byly dvě opakování.

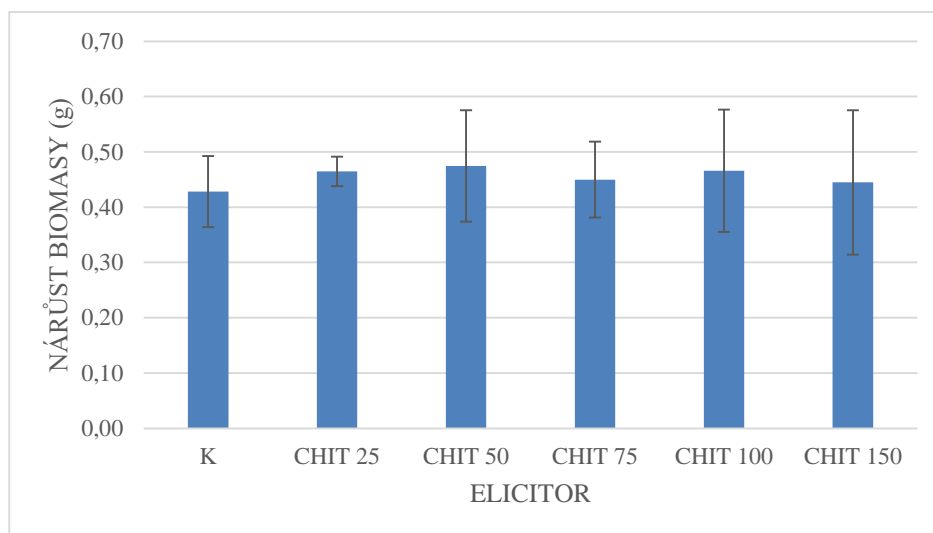
Tab. 5: Tekuté SH médium (Schenk, Hildebrandt, 1972)

Zásobní roztok	Složení	Konečná koncentrace v médiu mg/l
B	KNO ₃	2500
	MnSO ₄ ×H ₂ O	13,2
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	1
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,2
SH	H ₃ BO ₃	5
	KI	1
	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,1
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,1
MgSO₄	MgSO ₄ ×7H ₂ O	400
NH₄H₂PO₄	NH ₄ H ₂ PO ₄	300
F	Na ₂ EDTA	20
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	15
D	CaCl ₂ ×2H ₂ O	200
	Thiamin- hydrochlorid	5
Vitamíny	Kyselina nikotinová	5
	Pyridoxin- hydrochlorid	0,5
Inositol		1g
Sacharosa		30 g
pH 5,75- 5,8		
SHIK	+ 5 mg/l IBA + 0,025 mg/l Kin	

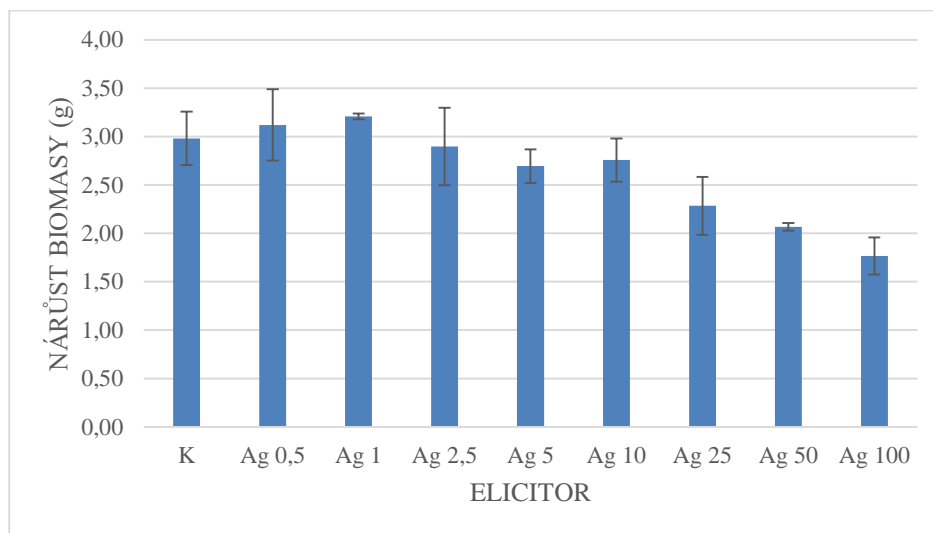
5. Výsledky

5.1. Vliv elicitorů na nárůst kořenné biomasy *Panax ginseng*

Obrázek 12 – 17 zobrazuje výsledky sledování nárůstu kořenné biomasy *Panax ginseng* po kultivaci po dobu 6 týdnů, kdy začátkem 4. týdne byl za sterilních podmínek přidán elicitor. Výsledky jsou průměrem tří až čtyř opakování.

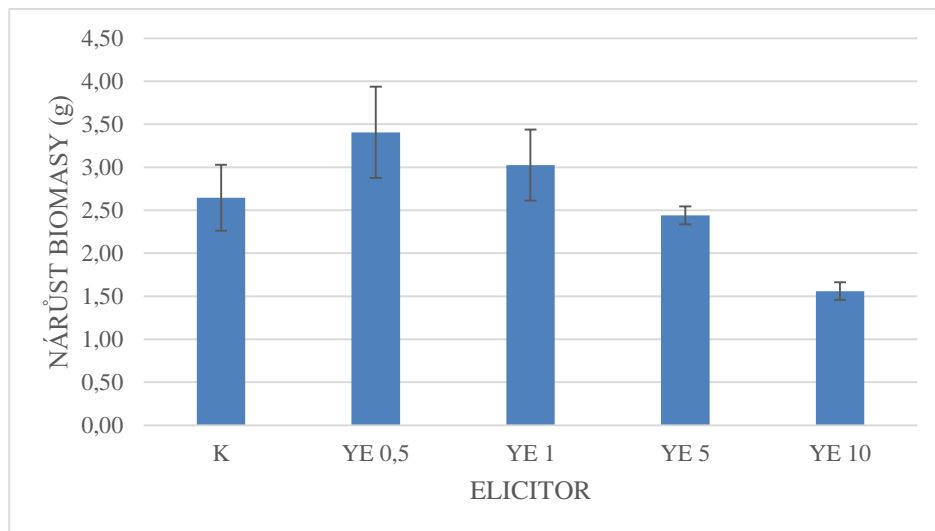


Obr. 12: Vliv elicitace CHIT na nárůst biomasy za 6 týdnů
(K = 0,1 N kyselina octová, pH = 5,2)

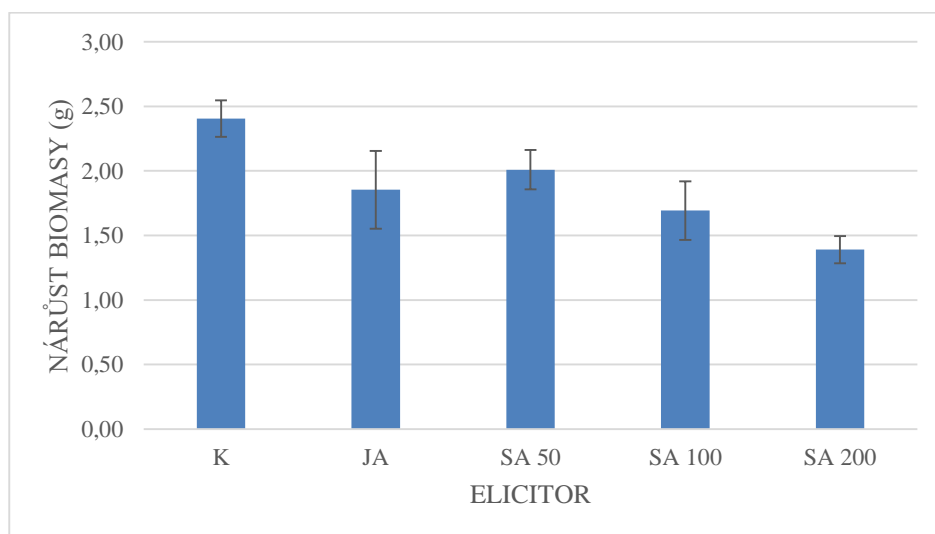


Obr. 13: Vliv elicitace AgNO_3 na nárůst biomasy za 6 týdnů (K = H_2O)

Z obr. 12 je zřejmé, že CHIT neovlivnil tvorbu kořenné biomasy. Naopak přídavek Ag (viz obr. 13) vedl ke koncentračně-závislému snížení tvorby kořenné biomasy.

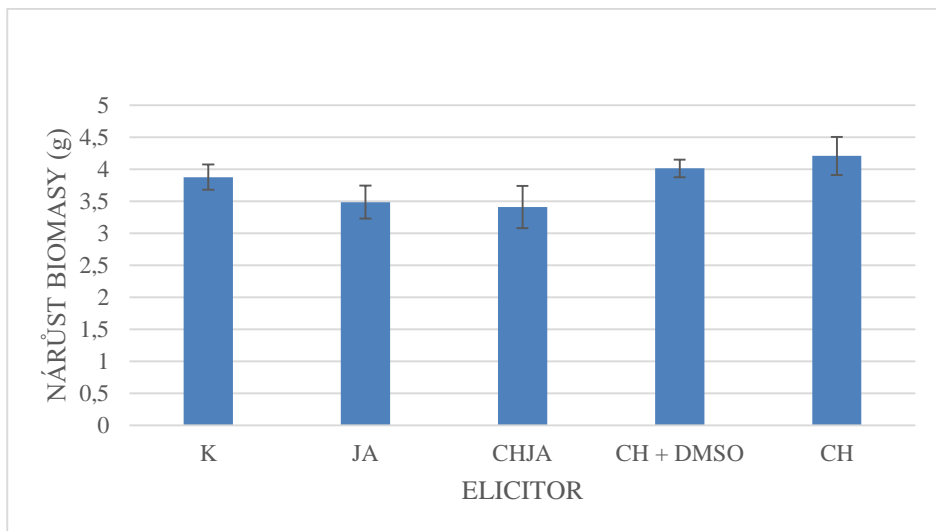


Obr. 14: Vliv přítomnosti a koncentrace YE na nárůst biomasy za 6 týdnů (K = H₂O)

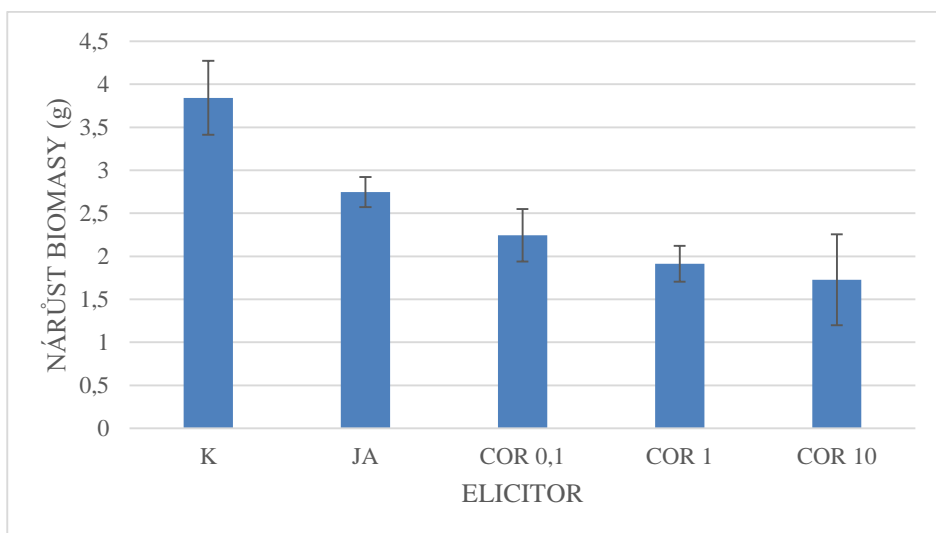


Obr. 15: Vliv přítomnosti a koncentrace SA a JA na nárůst biomasy za 6 týdnů (K = DMSO)

Z obr. 14 je zřejmé, že YE jako elicitor (v závislosti na koncentraci) působí výrazné ovlivnění nárůstu kořenné biomasy, kde nižší koncentrace YE vedla ke zvýšení nárůstu kořenné biomasy oproti kontrole. Vyšší koncentrace YE působí opačně. SA i JA ovlivňují nárůst jednoznačně negativně (viz obr. 15).



Obr. 16: Vliv elicitace CH a JA na nárůst biomasy za 6 týdnů (K = H₂O)

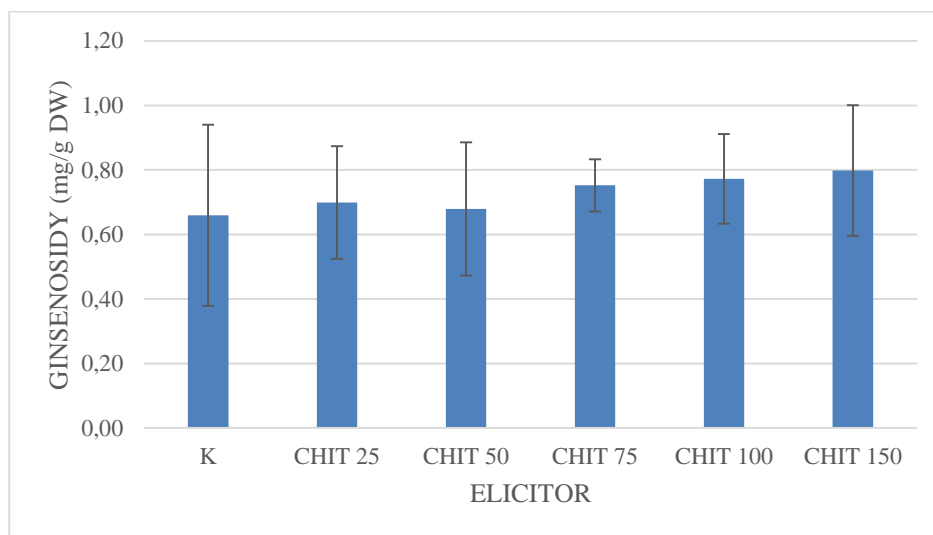


Obr. 17: Vliv elicitace COR a JA na růst biomasy za 6 týdnů (K = H₂O)

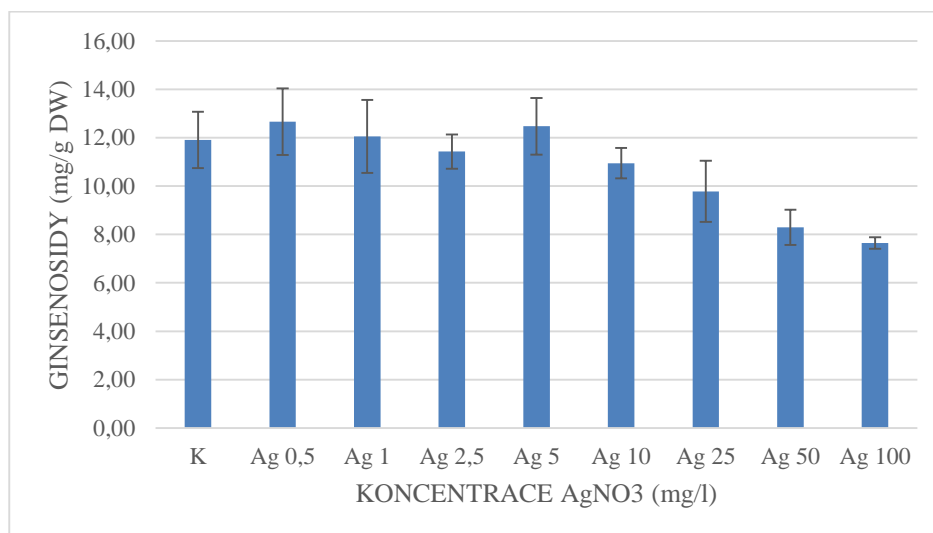
Z obr. 16 vyplývá, že CH zásadně neovlivňuje tvorbu kořenové biomasy. Z obr. 17 plyne, že se zvyšující se koncentrací COR klesá objem kořenové biomasy. JA rovněž zpomaluje nárůst biomasy.

5.2. Vliv koncentrace elicitoru na množství ginsenosidů *Panax ginseng*

Pomocí UPLC analýzy bylo zjištěno množství ginsenosidů ve vzorcích. Obrázky 18 – 23 ukazují, jak působí koncentrace jednotlivých elicitorů na množství ginsenosidů v kořenových kulturách *Panax ginseng* (vztaženo na hmotnost sušiny = DW).

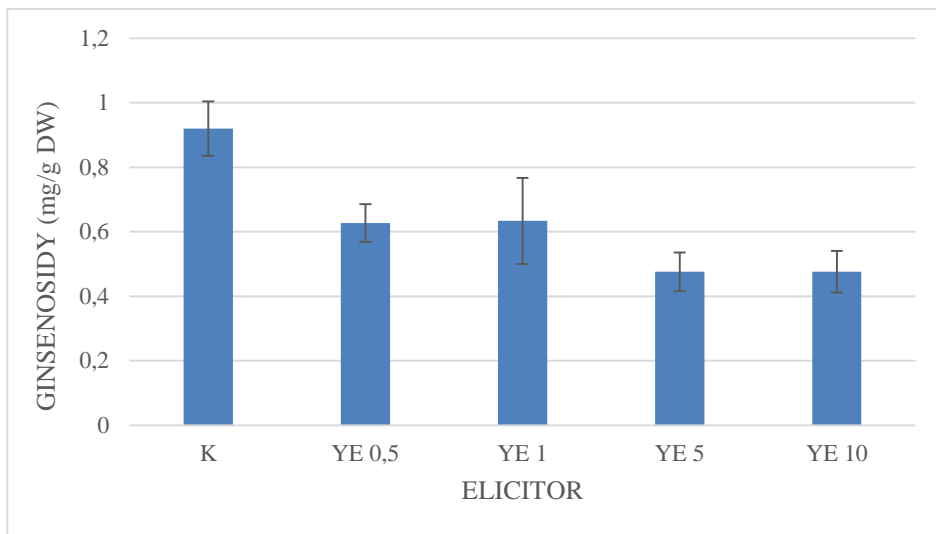


Obr. 18: Vliv koncentrace CHIT na obsah ginsenosidů sušiny
(K = 0,1N kyselina octová, pH = 5,2)

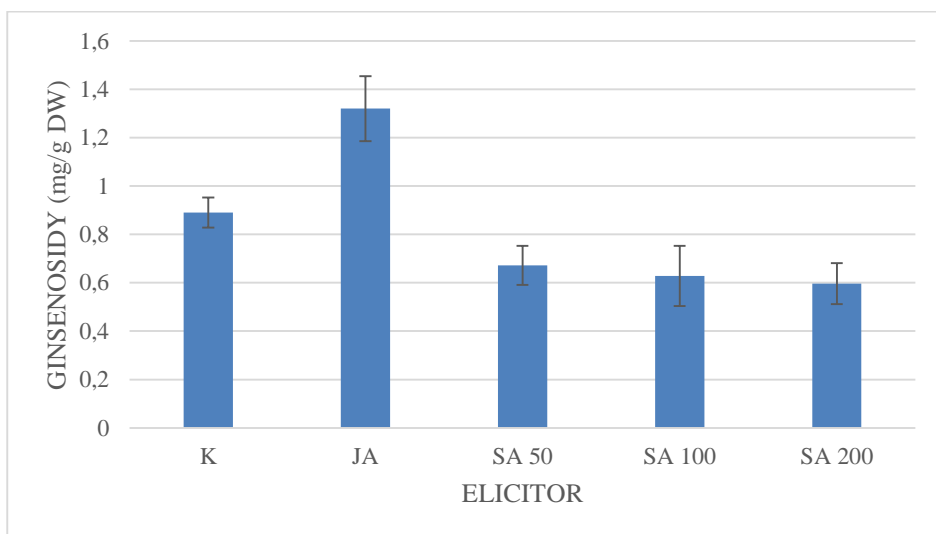


Obr. 19: Vliv elicitace AgNO₃ na obsah ginsenosidů v sušině (K = H₂O)

CHIT způsobil mírně zvýšený koncentračně-závislý nárůst ginsenosidů v sušině (viz obr. 18). V závislosti na rostoucí koncentraci Ag klesá obsah ginsenosidů v sušině (viz obr. 19).

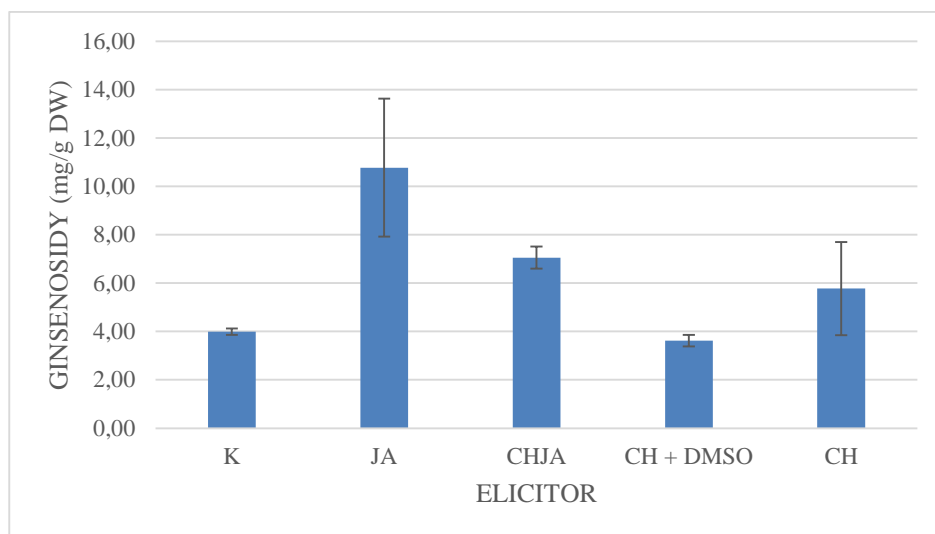


Obr. 20: Vliv elicitace pomocí YE na obsah ginsenosidů sušiny (K = H₂O)

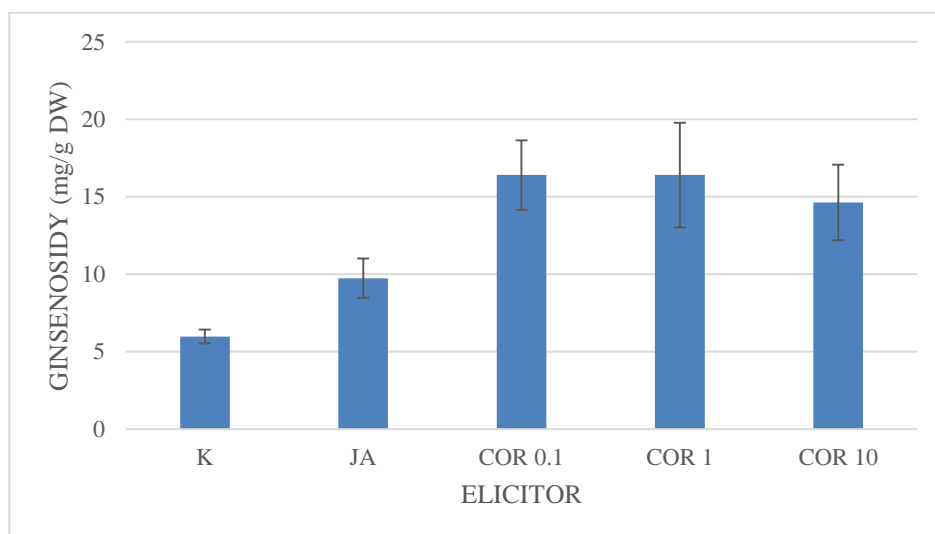


Obr. 21: Vliv elicitace pomocí SA a JA na obsah ginsenosidů sušiny (K = DMSO)

YE ani SA nezvyšují obsah ginsenosidů v sušině (viz obr. 20 a obr. 21)



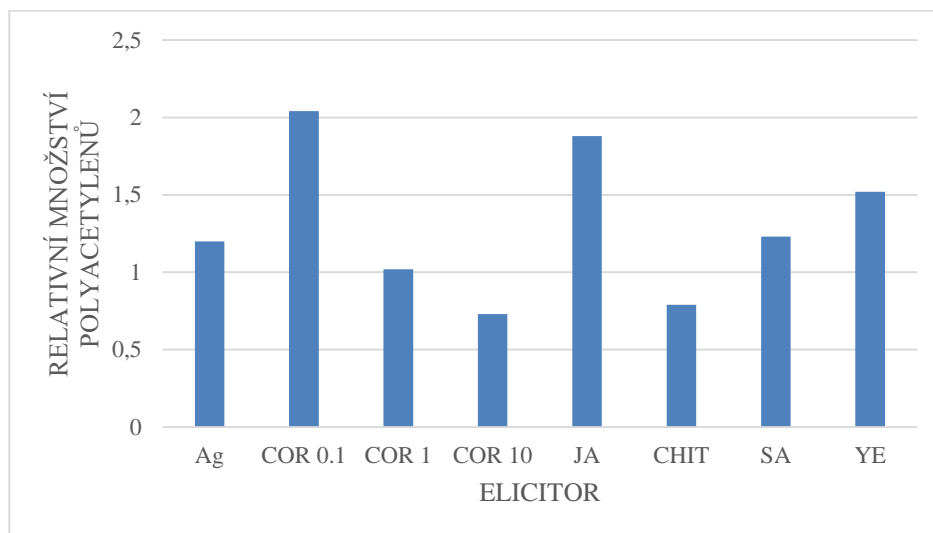
Obr. 22: Vliv elicítace CH a JA na obsah ginsenosidů sušiny (K = DMSO)



Obr. 23: Vliv elicítace COR a JA na obsah ginsenosidů v sušině (K = H₂O)

JA stimuluje produkci ginsenosidů v sušině (viz obr. 21 - 23). CH a především v kombinaci s JA, zvyšuje obsah ginsenosidů. Ne však tolik jako samotná JA (viz obr. 22). COR, především v nízkých koncentracích, stimuluje produkci ginsenosidů ještě více než JA (viz obr. 23).

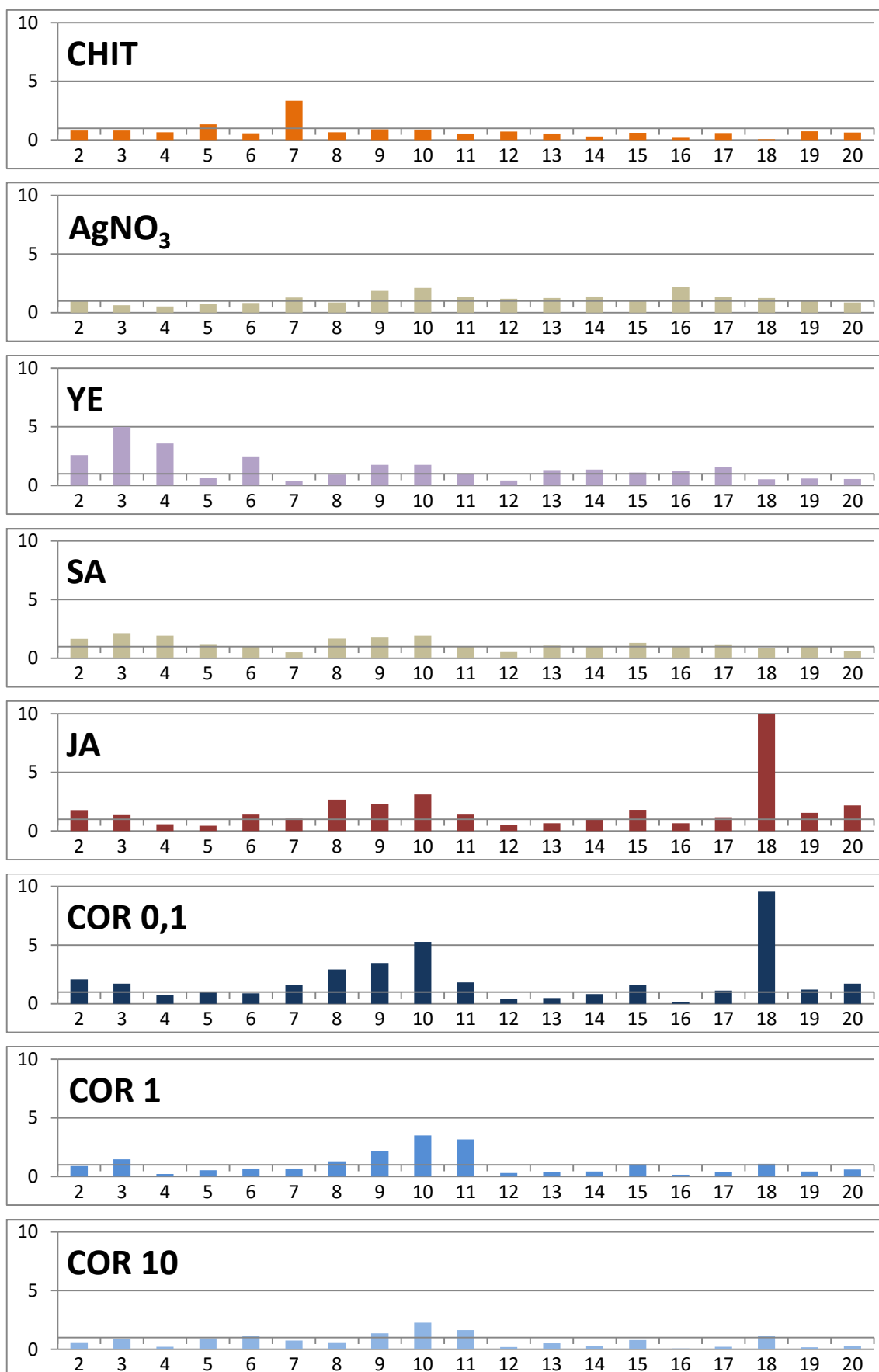
5.1. Vliv elicitorů na obsah polyacetylenů v kulturách *Panax ginseng*



Obr. 24: Vliv elicitorů na celkové relativní množství jednotlivých polyacetylenů v kultuře *Panax ginseng* (celkové množství polyacetylenů v kontrole = 1)

K největšímu zvýšení množství polyacetylenů oproti kontrole došlo u vzorků elicítovaných COR 0,1 μM (viz obr. 24).

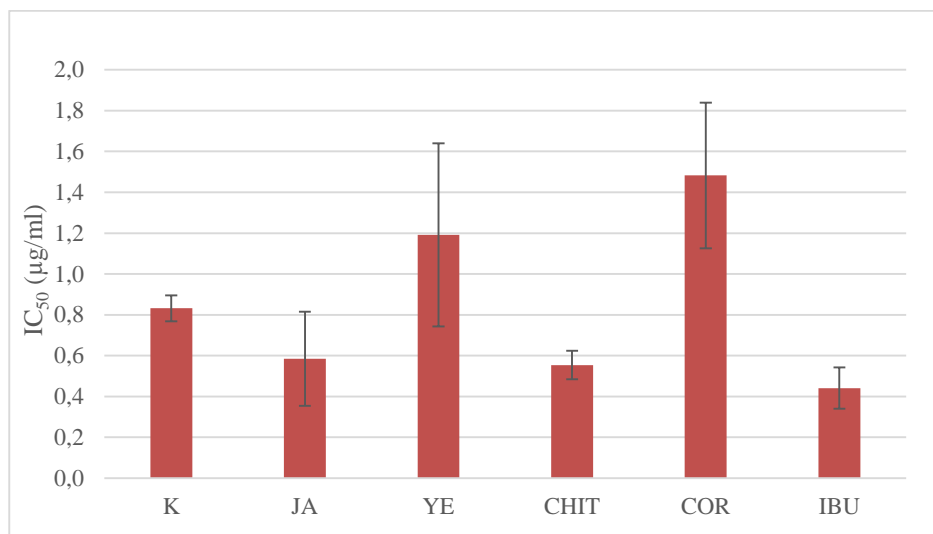
Pomocí UPLC analýzy bylo zjištěno relativní množství jednotlivých polyacetylenů (označených 2 – 20 podle pořadí eluce) ve vzorcích s různými elicitory. Vliv přítomnosti elicitorů na množství jednotlivých polyacetylenů ve vzorcích demonstruje obr. 25. Z výsledků je patrné, že elicitory ovlivňují nejen celkové množství, ale i relativní zastoupení polyacetylenů. Na základě těchto výsledků byly vybrány elicitory pro přípravu kultur na testování biologické aktivity.



Obr. 25: Relativní obsah jednotlivých polyacetylenů (označených čísly dle pořadí eluce při UPLC) v elicovaných vzorcích (množství jednotlivých polyacetylenů v kontrole = 1)

5.1. Schopnost elicitovaných kořenových kultur *Panax ginseng* inhibovat COX-2

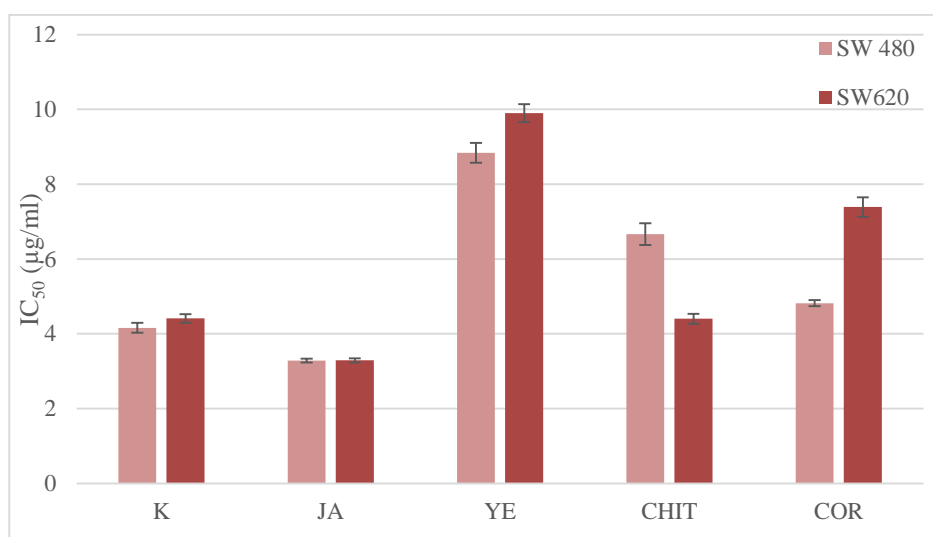
Výsledky enzymatického testu inhibiční aktivity COX-2 vyjádřené pomocí IC_{50} znázorňuje obrázek 26. V testech byl použit ibuprofen (IBU) jako pozitivní kontrola. Nejvyšší inhibiční efekt kořenových kultur byl zjištěn při použití CHIT jako elicitoru.



Obr. 26: Účinek inhibice COX-2 (K = DMSO)

5.2. Schopnost elicitovaných kořenových kultur *Panax ginseng* inhibovat proliferaci nádorových buněk

Obrázek 27 znázorňuje výsledky testování cytotoxického působení na nádorové buňky. Pro toto testování byly použity extrakty získané metodou uvedenou v kapitole 4.2.6. Antiproliferační aktivita byla zřejmě nejvyšší u vzorků elicitovaných JA, a to u obou nádorových linií.



Obr. 27: Antiproliferační aktivita polyacetylenů elicitovaných vzorků *Panax ginseng* studována na dvou nádorových liniích (SW480 = bez metastáz, z primárního adenokarcinomu tlustého střeva; SW620 = jeho metastazující derivát)

6. Diskuze

Panax ginseng je přírodní produkt pro podporu zdraví. V dnešní době roste zájem společnosti o zdravý životní styl, přírodní potravinové doplňky a alternativní medicínu. Její nedílnou součástí je medicína čínská, kam patří i *Panax ginseng* a produkty z něj. Na současném trhu najdeme mnoho přípravků z *Panax ginseng*. Vyskytují se v mnoha různých lékových formách jako kapsle, tablety, ampulky, tekuté i tuhé extrakty. Jednotlivé přípravky se od sebe liší obsahem účinných látek i jejich kvalitou, a tedy i farmakologickým efektem (Bacílková, 2009).

Vzhledem k farmakologickému významu obsahových látek *Panax ginseng* je velmi důležité najít optimální postup pro jeho *in vitro* pěstování, který by zaručoval vysoký a standardní obsah biologicky aktivních látek.

Cílem této práce bylo sledovat vliv elicitace na nárůst biomasy a významných obsahových látek kořenových kultur *Panax ginseng in vitro*. Cílem bylo ovlivnění biomasy tak, aby produkovala co nejkvalitnější sekundární metabolity v co největší míře a aby zůstala zachována biologická aktivita sekundárních metabolitů. V projektu jsme sledovali účinek jak biotických, tak i abiotických elicitorů v různých koncentracích po dobu 6 týdnů. Zabývali jsme se jejich vlivem na produkci ginsenosidů a polyacetylenů. Dílčím úkolem bylo zjistit optimální koncentrace jednotlivých elicitorů. Dalším úkolem bylo studovat biologickou aktivitu (antiproliferační aktivitu na nádorové buňky, inhibici cyklooxygenasy) *in vitro* kořenových kultur *Panax ginseng*.

Pro tuto práci bylo vybráno 7 elicitorů a regulátorů růstu. Všechny vybrané elicitory stimulují nějakou formu odpovědi rostlinné buňky na stres. Během kultivace byl zaznamenáván nárůst biomasy u jednotlivých vzorků. Kvantitativní hodnocení obsahu ginsenosidů i polyacetylenů v jednotlivých kulturách bylo provedeno pomocí UPLC.

CHIT významně neovlivňuje tvorbu biomasy. Se zvyšující se koncentrací CHIT se zvyšuje obsah ginsenosidů v sušině. Tento polysacharid se projevuje jako účinný elicitor, který zvyšuje permeabilitu buněk, ale pouze v závislosti na rostlinném druhu. Zvýšení produkce sekundárních metabolitů je prokázáno např. u kořenů *Hyoscyamus muticus (Solanaceae)* (Palazón et al., 2003).

Dusičnan stříbrný se u *Panax ginseng* neprojevil jako významný elicitor. V nízkých koncentracích (0,5 – 5 mg/l) mírně zvyšuje nárůst biomasy. Ve vyšších

koncentracích (10 – 100 mg/l) ho naopak brzdí. To potvrzuje fakt, že vysoká koncentrace dusíku má negativní vliv na růst buněk a biosyntézu saponinů (Kim et al., 2005). Bylo ale zaznamenáno mírné zvýšení obsahu ginsenosidů u koncentrací 0,5 mg/l a 5 mg/l AgNO₃.

Na nárůst kořenové biomasy měl vliv YE. Především u koncentrace 0,5 g/l YE, kdy se množství biomasy oproti kontrole bez elicitoru zvýšilo téměř o 22 %. Avšak koncentrace 5 g/l YE už množství biomasy snižuje. U všech použitých koncentrací mělo použití YE jako elicitoru negativní vliv na obsah ginsenosidů.

U hormonálního abiotického elicitoru SA došlo při použití vyšších koncentrací až k 42% úbytku množství biomasy oproti kontrole. Naše výsledky potvrzují negativní dopad SA na čerstvou hmotnost adventivních kořenů (Rahimi et al., 2014). Projevil se také významný negativní vliv na obsah ginsenosidů. SA je dobře známý induktor systémově získané rezistence, není ale univerzální induktor produkce sekundárních metabolitů (Zhao et al., 2005).

Jako elicitor jsme použili i endogenní rostlinný hormon JA. U JA je prokázáno, že zvyšuje produkci řady sekundárních metabolitů (Gorelick, Bernstein, 2014) a naše výsledky toto potvrzují. JA téměř nezvyšuje celkový obsah biomasy, ale množství ginsenosidů v sušině ano. Elicitací pomocí JA bylo získáno 10,77 mg ginsenosidů/g sušiny *Panax ginseng in vitro* (viz obr. 22). JA je tedy vhodným elicitem pro získání *Panax ginseng* s vysokým obsahem ginsenosidů. To potvrzují výsledky i zahraniční studie (Yu et al., 2002). Proto jsme JA používali v našich experimentech jako pozitivní kontrolu elicítace ginsenosidů.

Použití CH jako elicitoru významně neovlivnilo nárůst kořenové biomasy. Při kombinaci CH a JA byl pokles v obsahu ginsenosidů oproti JA bez CH, kde se projevil významný nárůst vůči kontrole.

Na základě stanovení obsahu ginsenosidů v kulturách s různými elicitory vyplývá, že velký vliv na množství ginsenosidů v sušině má COR i přesto, že při jeho použití nedochází k nárůstu kořenové biomasy. Se zvyšující se koncentrací COR je růst tlumen. Přítomnost COR v médiu zvyšuje produkci taxanů v *Taxus media* (*Taxaceae*), kde byla použita optimální koncentrace pro jejich produkci, 1 μM COR (Onrubia et al., 2013). Výsledky použití COR u *Panax ginseng* napovídají, že čím nižší koncentrace elicitoru, tím vyšší obsah ginsenosidů v sušině. Bylo by třeba dalších pokusů, které by ověřily vliv ještě nižších koncentrací COR na obsah ginsenosidů v *Panax ginseng*.

U kořenových kultur *Panax ginseng in vitro* byla jako optimální koncentrace zvolena 0,1 μM COR. Tato koncentrace nezvyšuje nárůst biomasy, ale produkce ginsenosidů je ještě vyšší než při použití JA, a to o téměř 40 %. Použití 0,1 μM COR vede ke zvýšení množství ginsenosidů i polyacetylenů v *in vitro* kořenových kulturách *Panax ginseng*.

Množství polyacetylenů bylo pomocí UPLC měřeno u těch vzorků, kde předpokládáme zvýšenou produkci sekundárních metabolitů obecně. Jedná se o následující: AgNO_3 5 μM , COR 0,1 μM , COR 1 μM , COR 10 μM , JA 5 mg/l, SA 50 μM , YE 5 g/l.

Dusičnan stříbrný produkci polyacetylenů zvyšuje nejméně ze všech zkoušených elicitorů. Naopak COR jejich produkci významně zvyšuje. Z našich výsledků COR vyplývá jako nejpříznivější elicitor pro produkci polyacetylenů. Při koncentraci COR 0,1 μM byla produkce polyacetylenů $2,04 \times$ vyšší oproti kontrole.

U vzorků ovlivněných vybranými elicitory byla dále zjišťována protizánětlivá aktivita (schopnost inhibovat COX-2) a antiproliferační aktivita na nádorových buňkách. Pro testování byly vybrány vzorky se zvýšeným množstvím určitých polyacetylenů. Polyacetyleny byly identifikovány pomocí UV spektra, kde mají 3 maxima okolo 252 nm, 266 nm a 281 nm.

Schopnost inhibovat COX-2 aktivitu byla nejvíce zvýšena u extraktů vzorků elicítovaných pomocí CHIT a JA. Extrakty vzorků elicítovaných COR a YE měly IC_{50} COX-2 výrazně nižší než kontrola.

Antiproliferační aktivita vzorků byla nejvyšší při použití JA jako elicitoru. Pokud byl použit CHIT, byla antiproliferační aktivita vyšší u nádorové linie metastazující než u té bez metastáz. Při použití COR byla vyšší antiproliferační aktivita u nemetastazující nádorové linie.

Vzorky elicítované CHIT měly největší zastoupení polyacetylenů 7 ze všech vzorků. Polyacetylen 7 má pravděpodobně klíčovou úlohu a bude potřeba ho izolovat a podrobit ho podrobnější analýze. Vzorky elicítované JA měly zvýšený obsah polyacetylenů 2, 3, 8, 9, 10, 11 a 18. Projevila se u nich schopnost inhibovat COX-2 i antiproliferační aktivita, která ale nebyla výraznější oproti kontrole a ostatním elicitorům.

Vzorky elicítované pomocí YE měly vyšší obsah polyacetylenů 2, 3, 4, a 6, zatímco u vzorků kultury elicítované pomocí COR 0,1 μM došlo k nárůstu množství polyacetylenů 2, 3, 8, 9, 10, 11 a 18. Avšak u vzorků elicítovaných jak pomocí YE, tak i COR byla zjištěna nejnižší biologická aktivita.

Polyacetyleny vykazují řadu biologických aktivit. Např. falcarinol a falcarindiol mají protizánětlivé a antiagregační účinky na krevní destičky a jsou cytotoxické (Christensen et al., 2006). Falcarinol je svojí 1, 9- dien- 4, 6- diyn strukturou analogem kyseliny arachidonové (Alanko et al., 1994). Polyacetyleny jsou inhibitory aktivace a exprese nukleárního faktoru kappa B (viz obr. 3), který se podílí na regulaci COX-2 (Zhang et al., 2013).

COX-2 je jeden z klíčových enzymů podílejících se na konverzi kyseliny arachidonové na prostaglandiny, mediátory zánětu (Zhang et al., 2013). Selektivní inhibitory COX-2 patří mezi nesteroidní protizánětlivé látky. Od jejich užívání se díky jejich závažným, především kardiovaskulárním nežádoucím účinkům ustupuje, i když byly vyvíjeny s vidinou těch bezpečnějších inhibitorů cyklooxygenasy. Dnes ale pomalu nacházejí uplatnění například při léčbě rakoviny, schizofrenie a Alzheimerovy nemoci (Chakraborti et al., 2010). U mnoha typů lidských nádorů existují důkazy o zvýšené expresi COX-2 (Nešporová, 2009). Exprese COX-2 byla pozitivní i u kožních nádorů. Protirakovinné účinky inhibitorů COX-2 byly hlášeny u karcinomu prsu, jícnu, plic (Amirnia et al., 2014). I proteiny podílející se na nádorové transformaci střevních buněk ovlivňují expresi COX-2 (Nešporová, 2009).

V našich experimentech vykazovaly kultury elicítované JA a CHIT zvýšenou schopnost inhibovat COX-2 i zvýšenou antiproliferační aktivitu na střevní nádorové buňky. Inhibice COX-2 by tedy mohla být jedním z mechanismů antiproliferačního působení látek obsažených v těchto kulturách. Identifikace obsahových látek a další testování jejich biologických aktivit budou předmětem dalších studií.

Výsledky této diplomové práce naznačily možnosti efektivnější produkce ginsenosidů a polyacetylenů. To by mohlo přispět ke zlepšení kvality produktů obsahujících *Panax ginseng* a k dalšímu objasňování biologických účinků těchto sekundárních metabolitů.

7. Závěr

- Byl sledován vliv jednotlivých elicitorů na nárůst biomasy v *in vitro* kořenových kulturách *Panax ginseng* po dobu 6 týdnů. Produkci biomasy nejvíce zvýšil YE o koncentraci 0,5 g/l.
- Optimální elicitor pro produkci ginsenosidů byl COR. Jako optimální koncentrace se jeví 0,1 μ M.
- Optimální elicitor pro produkci polyacetylenů byl COR. Jako optimální koncentrace se jeví 0,1 μ M.
- Extrakt z kořenové kultury inhiboval COX-2 a měl antiproliferační účinky na střevní nádorové buňky. Ke zvýšení těchto biologických aktivit vedlo použití CHIT a JA jako elicitoru.

8. Seznam zkratek

2, 4-D	kyselina 2, 4- dichlorfenoxyoctová
ATCC	American Type Culture Collection
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
COR	koronatin
COX-2	cyklooxygenasa 2
CYP	cytochrom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DW	hmotnost sušiny
FBS	fetální bovinní sérum
H₂O	voda čištěná pomocí zařízení SCI-AQUA HPLC UV
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
CH	kasein hydrolyzát
CHIT	chitosan
IAA	kyselina indol- 3- octová
IBA	kyselina idolyl- 3- máselná
IC₅₀	inhibiční koncentrace (koncentrace zkoušené látky mající za následek 50% úhyn či 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku)
JA	kyselina jasmonová
LC	kapalinová chromatografie
MJ	methylester kyseliny jasmonové
MS	hmotnostní spektrometr
PBS	fosfátový pufr
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxizomů
PPD	protopanaxadiol
PPT	protopanaxatriol
SA	kyselina salicylová
SH	Schenk- Hildebrandtovo médium
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie (Ultra Performance Liquid Chromatography)
YE	kvasničný extrakt

9. Seznam použité literatury

1. Alanko, J. et al., (1994): Panaxynol, a polyacetylene compound isolated from oriental medicines, inhibitor mammalian lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology* 48: 1979-1981
2. Amirnia, M. et al., (2014): Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 in skin tumors. *Journal of Dermatological Treatment* 25: 380-387
3. Attele, A. S. et al., (1999): Ginseng pharmacology: multiple constituent and multiple actions, *Biochemical Pharmacology* 58: 1685 – 1693
4. Bacílková, A., (2009): Metabolické profily bioaktivních látek ženšene *Panax ginseng* C. A. Meyer v rostlinném materiálu různého původu. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové
5. Barciszewski, J. et al., (2007): Kinetin- A multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules* 40: 182-192
6. Budde, I. P., (1999): Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf die Interaktion von *Pseudomonas syringae* mit Wirts- und Nichtwirtspflanzen. Doktorská disertační práce, Univerzita v Marburgu
7. Creelman, R. A., Mullet, J. E., (1995): Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4114-4119
8. Croisier, F., Jérôme, Ch., (2013): Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 49: 780-792
9. Cusido, R. M. et al., (2014): A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances* 32: 1157-1167
10. Fasinu, P. S. et al., (2016): Clinically relevant Pharmacokinetic herb-drug interactions in antiretroviral therapy. *Current Drug Metabolism*, 17: 52-64
11. Flasiński, M. et al., (2015): Characteristics of the influence of auxins on physicochemical properties of membrane phospholipids in monolayers at their/aqueous solution interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136: 1131-1138
12. Flasiński, M., Hać-Wydro, K., (2014): Natural vs synthetic auxin: Studies on the interactions between plant hormones and biological membrane lipids. *Environmental Research* 133: 123-134

13. Fulder, S., (1998): O ženšenu. PRAGMA, Hodkovičky
14. Gillis, C. N., (1997): *Panax ginseng* pharmacology: A nitric oxide link? *Biochemical Pharmacology* 54: 1-8
15. Gorelick, J., Bernstein, N., (2014): Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Advances in Agronomy* 124: 201-230
16. Gundlach, H. et al., (1992): Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89. 2389-2393
17. Heinerman, J., (2001): 7 báječných přírodních léků. EUROMEDIA CS, s.r.o.: 119-146
18. Hong, B. N. et al., (2015): The effects of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* on thermoregulation in animal models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015: ID 748041
19. Hu, Z. et al., (2005): Herb- drug interactions: a literature review. *Drugs* (65) 9: 1239-1282
20. Chakraborti, A. K. et al., (2010): Progress in COX-2 inhibitors: A journey so far. *Current Medicinal Chemistry* 17: 1563-1593
21. Chen, S. et al., (2014): Ginseng and anticancer drug combination to improve cancer chemotherapy: A critical review. *Hindawi Publishing Corporation: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
22. Choi, K. T., (2008): Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Acta Pharmacologica Sinica* 29 (9): 1109-1118
23. Christensen, L. P., (2009): Ginsenosides: Chemistry, biosynthesis, analysis and potential health effects. *Advances in Food and Nutrition Research* 55: 1-99
24. Christensen, L. P., Brandt, K., (2006): Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 683-693
25. Christensen, L. P., Jensen, M., (2009): Biomass and content of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng roots can be increased without affecting the profile of bioactive compounds. *Journal of Natural Medicines* 63: 159-168
26. Imran, M. et al., (2016): Yeast extract promotes decolorization of azo dyes by stimulating azoreductase activity in *Shewanella* sp. Strain IFN4. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124: 42-49

27. Jahodář, L., (2006): Farmakobotanika, Karolinum, Praha
28. Janča, J., Zentrich, J. A., (1997): Herbář léčivých rostlin 5. díl. EMINENT: 140-143
29. Kim, J. H. et al., (2005): Saponin production in submerged adventitious root culture of *Panax ginseng* as affected by culture conditions and elicitors. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 13: 87-91
30. Kim, K., (2015): Effect of ginseng and ginsenosides on melanogenesis and their mechanism of action. *Journal of Ginseng Research* 39: 1-6
31. Kolektiv autorů: Český lékopis 2009. 1.vyd. Praha: Grada publishing, 2009
32. Kuklev, D. V. et al., (2013): Bioactive acetylenic metabolites. *Phytomedicine* 20: 1145-1159
33. Kuzel, S. et al., (2009): Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7907-7911
34. Langhansová, L. et al., (2005): Production of saponins from *Panax ginseng* suspension and adventitious root cultures. *Biologia Plantarum* 49: 463-465
35. Langhansová, L. et al., (2012): Regulation of tissue differentiation by plant growth regulators on tTLCs of *Panax ginseng* adventitious roots. *Industrial Crops and Products* 35: 154-159
36. Lee, S. M. et al., (2015): Characterization of Korean red ginseng (*Panax ginseng* Meyer): History, preparation method, and chemical composition. *Journal of Ginseng Research* 39: 384-391
37. Negri, R., (2015): Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia* 106: 92-109
38. Nešporová, K., (2009): Úloha proteinů c-MYB a COX-2 ve střevních buňkách. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno
39. Nguyen, C. T. et al., (2015): *Panax ginseng* aqueous extract prevents pneumococcal sepsis in vivo by potentiating cell survival and diminishing inflammation. *Phytomedicine* 22: 1055-1061
40. Onrubia, M. et al., (2013): Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* 170: 211-219
41. Palazón, J. et al., (2003): Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 1019-1025

42. Peng, D. et al., (2012): Ginsenoside Re: Its chemistry, metabolism and pharmacokinetics. *Chinese Medicine* 2012, 7:2
43. Rahimi, S. et al., (2014): Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. *Russian Journal of Plant Physiology* 61: 811-817
44. Reininger, E. A., Bauer, R. (2006): Prostaglandin-H-synthase (PGHS)-1 and -2 microtiter assays for the testing of herbal drugs and in vitro inhibition of PGHS-isoenzymes by polyunsaturated fatty acids from *Platycodi radix*. *Phytomedicine* 13: 164-169
45. Růžička, K. et al., (2010): *Arabidopsis PISI* encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 10749-10753
46. Saad, A. I. M., Elshahed, A. M., (2012): Plant tissue culture media. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech. Dostupné z:
<<http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>> [cit. 2016-04-04]
47. Shao, J., Jia, L., (2013): Potential serious interactions between nutraceutical ginseng and warfarin in patients with ischemic stroke. *Trends in Pharmacological Sciences* 34: 85-86
48. Shergis, J. L. et al., (2014): Therapeutic potential of *Panax ginseng* and ginsenosides in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Complementary Therapies in Medicine* 22: 944-953
49. Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C., (1972): Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204
50. Sivakumar, G. et al., (2005): Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Engineering in Life Sciences*: 333-342
51. Sparg, S. G. et al., (2004): Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 219-243
52. Taik-Koo, Y., (2001): Brief introduction of *Panax ginseng* C.A.Meyer. *The Korean Academy of Medical Sciences* 16: 3-5
53. Tůmová, L. et al., (2007): *Panax ginseng* – interakce s ostatními léky, *Praktické lékařství* 3 (6)

54. URL: <<http://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-19340.html>> [cit. 2016-01-28]
55. URL: <<http://www.medaprex.cz/cs/magazin-krazy/slovník-pojmu/kyselina-salicylova-66.html>> [cit. 2015-11-19]
56. URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/y1625>> [cit. 2016-03-14]
57. URL: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=505938> [cit. 2016-04-25]
58. Vincken, J.- P. et al., (2007): Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68: 275-297
59. Wang, Ch. et al., (2016): Bioavailability of peptides from casein hydrolysate *in vitro*: Amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases. *Food Research International* 81: 188-196
60. Wang, J. et al., (2013): Effect of methyl jasmonate on the ginsenoside content of *Panax ginseng* adventitious root cultures and on the genes involved in triterpene biosynthesis. *Research on Chemical Intermediates* 39: 1973-1980
61. Wang, J. et al., (2013): Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chemistry Central Journal* 7: 62
62. Wiktorowska, E. et al., (2010): Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 14-20
63. Wu, J., Zhong, J.- J., (1999): Production of *ginseng* and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects. *Journal of Biotechnology* 68: 89-99
64. Yang, M. C. et al., (2008): Polyacetylenes from the roots of cultivated-wild *Ginseng* and their cytotoxicity *in vitro*. *Archives of Pharmacal Research* 31: 154-159
65. Yang, W.-z. et al., (2014): Saponins in the genus *Panax* L. (*Araliaceae*): A systematic review of their chemical diversity. *Phytochemistry* 106: 7-24
66. Yu, K.- W. et al., (2002): Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Biochemical Engineering Journal* 11: 211-215
67. Zhang, Y. et al., (2013): Coreosides A- D, C₁₄-polyacetylene glycosides from the capitula of *Coreopsis tinctoria* and its anti-inflammatory activity against COX-2. *Fitoterapia* 87: 93-97

68. Zhao, J. et al., (2005): Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333