

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Stanovení steroidních látek v pupenech rostlin využívaných pro
gemmoterapii**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala:	Bc. Klára Rášová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Klára Rášová
Název práce	Stanovení steroidních látek v pupenech rostlin využívaných pro gemmoterapii
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Diplomová práce se zabývá stanovením steroidních látek v listových pupenech rostlin, které jsou využívány pro gemmoterapii. Teoretická část diplomové práce zahrnuje literární rešerši, která popisuje léčebnou metodu gemmoterapie, dále je diskutován výskyt savčích steroidů a brassinosteroidů v rostlinách.</p> <p>V experimentální části diplomové práce byla nejprve provedena extrakce fytohormonů z rostlinného materiálu a následná purifikace na tuhé fázi. Nedílnou součástí experimentální části diplomové práce je kvantifikace pomocí UHPLC-MS/MS metody, vyhodnocení a zpracování dat. Rostlinný materiál byl sbírán ve spolupráci s Centrem Naděje Mgr. Jarmily Podhorné, Brodek u Konice.</p>

Klíčová slova	Gemmoterapie, brassinosteroidy, savčí steroidy, purifikace, kapalinová chromatografie, tandemová – hmotnostní spektrometrie.
Počet stran	53
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Bc. Klára Rášová
Title of thesis	Determination of steroid plant growth regulators in buds of plants used for gemmotherapy
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jana Okleštková, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>The diploma thesis is focused on the issue of steroid plant hormones in the leaf buds of plants that are used for gemmotherapy. The theoretical part of the diploma thesis includes a literature review describes the treatment method of gemmotherapy and the occurrence of mammalian steroids and brassinosteroids in plants is also discussed.</p> <p>In the experimental part of the diploma thesis, the extraction of phytohormones from plant material and subsequent purification on a solid phase was performed. For the determination of steroid compounds, ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was used and the results were evaluated. The plant material was collected in cooperation with the Center Naděje Mgr. Jarmily Podhorne, Brodek u Konice.</p>

Keywords	Gemmotherapy, brassinosteroids, mammalian steroids, purification, liquid chromatography-tandem spectrometry.
Number of pages	53
Number of appendices	3
Language	Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala sama pod vedením Mgr. Jany Oklešťkové, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Janě Oklešťkové, Ph.D. za vedení této diplomové práce. Děkuji za její ochotu, trpělivost, odborné konzultace a také za cenné rady při provedení experimentální části. Rovněž moc děkuji Ing. Petře Amakorové za pomoc při UHPLC-MS/MS měření. Také musím poděkovat svojí rodině za podporu při celém mém studiu.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory interního grantu PřF UP (IGA_PrF_2022_016 Studium endogenních hladin fytohormonů a jejich molekulárních mechanismů účinku).

Seznam použitých zkratek

AcCN – acetonitril
ANDR – androstendion
BAK1 – BRI1-associated receptor kinase 1
BIN2 – brassinosteroid-insensitive 2
BL – brassinolid
BRI1 – brassinosteroid insensitive 1
BRs – brassinosteroidy
BSK – BR-signaling kinase 1
BSU1 – BRI1 suppressor 1
CDG1 – constitutive differential growth 1
CN – campestanol
CR – cholesterol
CS – castasteron
CYP 85A1; 85A2 – cytochrom 85A1; 85A2
DHEA – 4-androsten-3,17-dion
DHT – 5 α -dihydrotestosteron
DMAPP – dimethylallyldifosfát
DOXP – 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátová cesta
ESI – elektrosprejová ionizace
HDL – lipoprotein s vysokou hustotou
homoCS – 28-homocastasteron
IPP – isopentenyldifosfát
KIB1 – kink suppressed in BZR1-1D
LDL – lipoprotein s nízkou hustotou
LRR – na leucin bohatá repetice
MeOH – methanol
MVA – mevalonátová cesta
norBL – 28-norbrassinolid
norCS – 28-norcastasteron
PP2A – fosfatáza 2A
PREG – pregnenolon

PRG – progesteron

RLK – receptor-like kinase

SBI1 – suppressor of BRI1

SPE – extrakce na pevné fázi

TEST – testosteron

TY – typhasterol

UHPLC-MS/MS – ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

OBSAH

1. Úvod a cíle diplomové práce.....	11
2. Teoretická část.....	12
3.1. Gemmoterapie	12
3.1.1. Význam gemmoterapie.....	12
3.1.2. Historie gemmoterapie	12
3.1.3. Principy použití.....	15
3.1.4. Extrakty z pupenů	16
3.1.5. Gemmoterapeutika z pupenů využívaných i v praktické části práce.....	17
3.1.6. Biochemická analýza pupenů	20
3.1.7. Účinné látky v léčivých rostlinách.....	21
3.1.8. Výhody gemmoterapie	23
3.1.9. Budoucnost gemmoterapie.....	23
3.2. Brassinosteroidy	24
3.1.1. Biosyntéza rostlinných sterolů a BRs.....	24
3.2.1. Signální dráha BRs.....	27
3.3. Steroidní hormony.....	29
3.3.1. Funkce steroidních hormonů.....	29
3.1.2. Biosyntéza steroidních hormonů	30
3. Experimentální část	32
3.1. Pomůcky a chemikálie.....	32
3.1.1. Pomůcky	32
3.1.2. Chemikálie.....	32
3.2. Metody práce	34
3.2.1. Extrakce vzorků pro analýzu BRs a steroidních látek	34
3.2.2. SPE purifikace	34
3.2.3. Analýza vzorků pomocí UHPLC-MS/MS.....	34
4. Výsledky.....	36
4.1. Stanovení hladin brassinosteroidů v rostlinném materiálu	36
4.2. Stanovení hladin savčích steroidních hormonů v rostlinném materiálu	39
5. Diskuze	42
6. Závěr	44
7. Seznam literatury	45
8. Přílohy	51

1. Úvod a cíle diplomové práce

Gemmoterapie je speciální metoda bylinné léčby, která využívá přípravky na bázi semen, pupenů a mladých výhonků rostlin, tzv. zárodečných tkání. Tyto zárodečné rostlinné tkáně jsou sklizeny na jaře, kdy obsahují nejvyšší množství biologicky aktivních látek nezbytných pro růst rostliny, a která mají rovněž významné biologické účinky na lidské zdraví. Aktivní látky jsou ze zárodečných tkání extrahovány do směsi etanolu a glycerinu a jsou využívány při různých zdravotních potížích.

Brassinosteroidy jsou rostlinné steroidní hormony, které hrají zásadní roli v regulaci mnoha důležitých fyziologických procesů v životě rostlin. BRs byly objeveny v 70. letech dvacátého století. Jako první brassinosteroid byl izolován z řepky olejné *Brassica napus* a jeho bioaktivní forma byla pojmenována brassinolid. BRs se vyskytují v rostlinách ve velmi malých koncentracích, nejvíce je přítomno v semenech, pylových zrnech, květech anebo kořenech. BRs podporují buněčné dělení, reprodukci, zrání i stárnutí rostliny.

Předkládaná diplomová práce se zabývá stanovením steroidních látek v pupenech rostlin využívaných pro gemmoterapii. Obsah těchto látek nebyl dosud u gemmoterapeutik plně prostudován.

Cílem této diplomové práce bylo napsat literární rešerši, která popisuje léčebnou metodu gemmoterapie a zabývá se rovněž problematikou výskytu steroidních látek v rostlinách.

V rámci praktické části bylo stanovení množství steroidních látek (brassinosteroidů a savčích steroidních látek) v listových pupenech rostlin, které se využívají ke gemmoterapii. Nejprve byla provedena extrakce a purifikace hormonů z rostlinného materiálu. Dále byla provedena kvantifikace pomocí UHPLC-MS/MS metody, vyhodnocení a zpracování dat.

2. Teoretická část

3.1. Gemmoterapie

3.1.1. Význam gemmoterapie

Gemmoterapie neboli „lčba pupeny“ je speciální bylinná léčebná metoda, která využívá výtažky vyrobené ze zárodečných tkání rostlin, jako jsou čerstvé pupeny, semena, klíčky, kořinky a mladé výhonky (Hubele, 2016; Andriane, 2007). Tyto bylinné prostředky se zpracovávají hlavně na jaře. Pupy jsou zpracovány v době pučení, kdy obsahují nejvyšší množství biologicky aktivních látek nezbytných pro růst rostliny, jako jsou růstové hormony, stopové prvky, enzymy a další látky s rozsáhlou působností (Zentrich, 2003). Gemmoterapeutické prostředky dodávají tělu komplexy rostlinných látek, v nichž jsou obsaženy růstové faktory, nejvíce auxiny a gibbereliny, které příznivě stimulují činnost celého organismu. Tyto prostředky se využívají při řešení různých zdravotních potíží. Gemmoterapie podporuje správnou funkci přirozené imunitní odpovědi, lymfatický a cévní systém pomocí detoxikace a výživy buněk, a také pomáhá k celkové detoxikaci organismu (Ercoli, 2002). Pro terapii je velice důležité znát celkový stav organismu, jak fyzický, tak i psychický, jelikož původ každé nemoci je ovlivněn mnoha faktory (Tetau, 2013).

Název gemmoterapie pochází z latinského slova „*gemma*“, což znamená pupen nebo drahokam, ale překládá se také jako „kamenná sůl“ nebo „borová pryskyřice“. Na pupen lze tedy nahlížet i jako na nerostnou strukturu bez zjevného života, která se vyvíjí v zimě, tedy v době, kdy je strom zdánlivě mrtvý. Rovněž si můžeme povšimnout, že „*gemmae*“ stojí u původu slova „*gemmule*“, které označuje vrcholovou část zárodku semena, z něhož po vyklíčení vznikne klíček (Andriane, 2007).

Výtažky z pupenů nepoškozují lidský organismus, nemají nežádoucí účinky a nezanechávají v těle žádný „odpad“. Gemmoterapie přináší pozoruhodné výsledky a mnozí nadšenci o ní hovoří jako o moderní terapii třetího tisíciletí (Podhorná, 2015).

3.1.2. Historie gemmoterapie

S používáním pupenů se můžeme setkat již ve středověku, kdy alchymisté prováděli empirické výzkumy. Nicméně tyto výsledky rychle upadaly v zapomnění především kvůli známým poznatkům léčitelství a využívání celých částí rostlin (Andriane, 2007).

V druhé polovině 20. století byla popsána metoda gemmoterapie – výtažky z pupenů, rostlin, stromů a keřů, ale pupeny již byly využívány o hodně dříve. Již minulé generace si všimly velice zajímavého poznatku, že divoká zvěř okusuje pupeny a mladé výhonky, jako kdyby tušila, že je právě v nich uložena životní síla a látky potřebné pro organismus. Například v ruském

léčitelství se podávaly pupeny břízy při chorobách ledvin a také k léčbě revmatismu (Donno et al, 2015; Šveňková, 2016).

Už ve 2. st. byl znám od Galéna balzám z pupenů topolu nakládaných po dobu tří měsíců v olivovém oleji. V průběhu času se velice zvyšoval zájem o kvalitu gemmopreparátů. Například Paracelsus pochopil rozdíly v jednotlivých částech rostlin. Dalšími důležitými faktory jsou věk a původ rostliny, způsob sběru a zpracování materiálu včetně skladování výsledného produktu (Donno et al., 2015).

V třicátých letech 20. století ruský učenec B. P. Tokin objevil ve vyšších kvetoucích rostlinách látky, které působí antimykoticky a antibioticky. Tyto látky nazval fytoncidy, které rostlina využívá k ochraně před nejrůznějšími škůdci. Vědci si však uvědomili, že by se tyto látky získané z rostlin daly využít k léčbě člověka. Později profesor V. P. Filatov zjistil, že pokud necháme utrženou část rostliny několik dní ve tmě a chladu, umírající část rostliny zmobilizuje své síly a začnou v ní vznikat mimořádně účinné látky fytoncidní povahy. Takto vznikl postup výroby velice proslulých biogenních stimulatorů. Tímto započal nový směr hledání nejučinnějších obsahových látek a komplexů, které se v rostlině vyskytují krátce a v přesně určený čas, eventuálně v přísně omezeném množství a jen v určitých částech rostliny (Zentrich, 2007).

V podobných experimentech jako Filatov pokračoval lékař Dr. Paul Henrych, který zjistil, že ještě mnohem účinnější látky vznikají v pupenech a zárodečných listech stromů a rostlin. P. Henrych se také inspiroval dr. Niehasem a jeho používáním živočišných buněk, a jako první vyslovil myšlenku využití meristemických částí rostlin jako metodu v terapii člověka, kterou nazval fytoembryoterapií (Adrienne, 2007). Henryho první práce s těmito myšlenkami byly publikovány v Archives Homeopatiques de Normandie v roce 1959. Správnost jeho úvah byla postupem času podložena v mnohých dalších publikacích z tohoto oboru (Donno et al., 2015). První studie se zabývala extraktem z břízy pýřité, u které Henry prokázal pozitivní účinek na játra, konkrétně jde o aktivaci makrofágů a drenáž Kupfferových buněk (Andrienne, 2007).

S Paulem Henrym dále spolupracoval francouzský lékař Max Tétou, který rozšířil jeho práci, a právě on zavedl pojem „gemmotherapie“. Dr. Max Tétou je také autorem významné knihy v tomto oboru, která se jmenuje Nouvelles cliniques de gemmotherapie (Andrienne, 2007).

Gemmoterapie v Čechách

O úplný začátek metody gemmotherapie se zasloužil moravský bylinář Rudolf Franěk z Holešova (1910–1981). O této novince se v 70. letech dozvěděl v německých novinách a rozhodl se tuto novinku představit v Čechách. Z výsledků Franěka dále vycházel bylinář Josef Antonín Zentrich (1941–2012), kterému byla v roce 1964 diagnostikována začínající leukémie, a právě Rudolf Franěk se stal jeho léčitelem. Ten Zentricha postupně vzdělával v oblasti přírodního

lčení a bylinkářství. Výuce a přípravě se věnoval usilovně více než 15 let a po smrti svého učitele převzal jeho klientelu a s léčitelstvím začal on sám (Zentrich, 2007).

Právě Josef A. Zenrich a Jiří Janča, významní bylináři a představitelé alternativní medicíny, se zasloužili o praktické využívání v Československu. Vycházeli z výsledků Franče a jako první v Československu o gemmoterapii informovali v 5. díle svého Herbáře léčivých rostlin. Bohužel nedostatek času na přípravy tinktur (např. sběr pupenů je náročný na čas i prostor), přibývaly zkušenosti v oblasti gemmoterapie velice pomalu. Lidé si tinktury naučily připravovat i sami doma a léčili tak své blízké (Zentrich, 2007).

V dnešní době máme v České republice čtyři oficiální výrobce gemmoterapeutik. Jsou to firmy: Rabštejnská apatyka Ing. Matyáše Orsáka, Bylinné kapky v čele s Ing. Pavlem Kadaňkou, Serafin byliny a Naděje pod vedením Mgr. Jarmily Podhorné.

Mgr. Jarmila Podhorná

Jako největší průkopnice gemmoterapie u nás je považována paní Mgr. Jarmila Podhorná, která se v roce 1998 na popud obou bylinkářů rozhodla zabývat gemmoterapií a založila firmu Naděje v Brodce u Konice. Jejím hlavním přáním vždy bylo a je, aby svou lásku k lidem a její zkušenosti v oblasti gemmoterapie a alternativní medicíny předala hlavně nemocným. Již od začátku se specializovala na výrobu přípravků bez nežádoucích účinnů, které na organismus působí pouze prospěšně. Své přípravky se snažila mít cenově dostupné a mohly se používat také jako prevence a ke zlepšení stavu při různých zdravotních problémech (Podhorná, 2015; Zentrich, 2007).

Paní Podhorná měla vždy velice blízko k přírodě, kterou milovala a obdivovala její dary. Bylinky pro ni byly velkým koníčkem, nejprve zkoušela experimentovat s výtažky z bylin a snažila se skrze ně pomáhat svým blízkým a přátelům, později i širší společnosti. Začala studovat a získávala informace v oblasti alternativní medicíny a snažila se porozumět lidskému organismu jako celku, jelikož onemocnění kteréhokoliv orgánu pokládala za nemoc celého organismu. Vycházela z holistických a celostních přístupů lékařů východní medicíny. S výrobou svých tinktur začínala doma ve sklepě. Její první tinktura z třezalky pomohla potlačit příznaky u roztroušené sklerózy. Její užívání vedlo ke zlepšení pohyblivosti a ke zklidnění organismu. Toto byl pro ni veliký posun kupředu a věděla, že je její cesta ve výrobě tinktur perspektivní (Podhorná, 2015; Naděje, 2021).

V současné době se byliny zpracovávají ve firmě, která nese název Naděje a sídlí v Brodce u Konice. Tato firma má dnes již více jak sto druhů bylinných tinktur. Mezi hlavní tinktury patří samozřejmě tinktury vyrobené z pupenů. Jak píše paní Podhorná: „rostlina v pupenech přechovává svůj genetický potenciál, proto v nich shromažďuje nejcennější látky, které tělo zotavují a současně vytvářejí i obranný mechanismus – prevenci proti nemocem. Její

výroba výtažků je velice komplexní, jelikož kombinuje tinktury tak, aby vznikaly celé „kúry“, neboli sestavy složené z několika různých tinktur vzniklých jak z celých bylin, tak i z pupenů. Tinktury mohou být v podobě výluhů, mastí, ale i například šampónů (Naděje, 2021; Podhorná, 2015).

Postupně se firma Naděje vyvíjela a zjišťovalo se, jak účinky samotných tinktur zvyšovat. Vznikly například patentově chráněné gemmoglukany, což jsou bylinné výluhy s mimořádnou účinností, získávané spojením výtažků z pupenů rostlin s dalšími mimořádně aktivními beta-glukany. Hlavní funkce beta-glukanu jsou zvyšování obranyschopnosti, aktivuje buňky slinivky, snižuje tlak a ovlivňuje hranici cholesterolu, dále může působit proti syndromům chronické únavy, podporuje krvetvorbu a posiluje obranu před působením stresu (Naděje, 2021)

Všechny výrobky jsou zatím certifikované jen jako potravinové doplňky, ale i tak je o firmu Naděje a její výrobky veliký zájem nejen v České republice, ale i v zahraničí (Naděje, 2021).

Paní Podhorná říká: „Léčba přírodní je většinou pomalá, ale zato s trvalejšími výsledky a nemá vedlejší účinky“ (Podhorná, 2016).

3.1.3. Principy použití

Gemmoterapie doplňuje jak homeopatii, fytoterapii nebo také akupunkturu. Gemmoterapie se používá sama o sobě, tedy v jednotné monoterapii nebo ve formě komplexů. Při používání ve formě komplexů se shromažďuje v jedné lahvičce několik druhů pupenů, které jsou navzájem spojené matečnou tinkturou nebo homeopatickými roztoky (Andrienne, 2007).

Gemmoterapie má různé principy používání. Andrienne popisuje třífázovou léčbu s týdenní pauzou po každých třech týdnech, kdy se vždy mimo jídlo podává 15 kapek ráno nebo pět kapek třikrát denně s tím, že dávkování zůstává stejné nebo se postupně zvyšuje z pěti kapek na 15-20 a nakonec opět snižuje na počáteční množství (Andrienne, 2007).

Princip podle Zentricha spočívá v jednom hlavním znaku. Jeho léčba je založena na dvojkombinaci nespecifických očištných prostředků a prostředků se specifickým zaměřením. V praxi to znamená, že: 1. podá se všeobecně očištná nespecifická bylinná tinktura, která se označuje jako „drenážní“, např. bříza, penízovka, 2. podá se specifický prostředek s konkrétním cílem, označované jako gemmoterapeutikum, např. líska – normalizuje krevní tlak (Zentrich, 2007).

Tento princip využívá i Jarmila Podhorná. V podstatě se jako první podává bylinný homeopatický preparát (drenáž), nebo jejich kombinace, a jako druhý se podává pupenový preparát, nebo zase jejich kombinace. Drenážní prostředek se podává proto, abychom zabránili odbourávání toxických zbytkových zplodin z vlastní látkové výměny. Podle Podhorné mají tyto

homeopatické tinktury spojené s extrakty pupenů veliký význam. Homeopatika dávají tělu informaci, aby zahájilo ozdravný proces a pupenové tinktury regenerují obsahem svých látek. Dochází zde ke skvělému propojení vlastností léčivých, pročišťujících i regenerujících (Podhorná, 2007).

Gemmoterapie se používá v jednotlivých tinkturách nebo ve formě komplexů (kúr). Komplexy jsou v České republice používány převážně Jarmilou Podhornou. Na každé kúře je popsán přesný postup užívání (Podhorná, 2007).

3.1.4. Extrakty z pupenů

Příprava

Způsoby přípravy gemmoterapeutických preparátů se mohou lišit. Obecně se používají lihoglycerinové extrakty vyrobené zásadně z čerstvých pupenů. Extrakty se mohou připravovat i z jiných rostlinných tkání, ale je velice důležité, aby pocházely z částí rostlin, které jsou bohaté na zárodečné buňky, např. mladé klíčky, kořinky atd. (Tetau, 2013; Donno et al., 2015).

Podle Andrienne a Hubele je známý tento postup: Čerstvé pupeny se dají vyluhovat do směsi lihu a glycerinu. Doba macerace je 21 dní v chladu a temnu za pravidelného promíchávání. Po vyluhování a přefiltrování se získá tekutina, nazývaná matečná tinktura nebo také koncentrovaný macerát. Získané maceráty se nakonec ředí směsí vody, lihu a glycerinu v poměru 1:10. Takto získáme lihoglycerinový macerát D1 nazývaný také mg 1D. Poměr mezi pupeny a výchozím rozpouštědlem je 1:20, což je ekvivalent váhy suchého pupenu (Hubele, 2016; Andrienne, 2007).

Podobný protokol vychází z francouzského lékopisu, jen s několika specifiky. Materiál je ihned po sběru očištěn, popřípadě rozmělněn, a poté macerován ve směsi 95% etanolu a glycerinu v poměru 1:1. Poměr rozpouštědla a pupenů o suché hmotnosti je opět 1:20 s tím, že u složek roztoku se rovněž jedná o váhové díly. Před macerací je zjišťována dehydratovaná hmotnost pupenů. Tato neměnná hmotnost nastane po vysušení materiálu při 105 °C po dobu několik dní. Maceráty se po třech týdnech slijí, přefiltrují, nechají dva dny stát a poté znovu přefiltrují. Takto vzniklá matečná tinktura se ředí v poměru 1:10 ve směsi 50 dílů glycerinu, 30 dílů etanolu a 20 dílů vody. Výsledný extrakt je nakonec dobře promíchán. Konečný produkt je testován na aroma, chuť, barvu a obsah alkoholu. Další modifikace přípravy extraktů může být např. ředění matečné tinktury v poměru 1,5:10 kvůli vyššímu terapeutickému potenciálu (Donno et al., 2015; Andrienne, 2007).

Produkty

V České republice se nejvíce objevují produkty firem Naděje a Rabštejn. Jarmila Podhorná a její firma naděje nabízí bylinné tinktury, které se označují písmenem T a pupenové

extrakty označované písmenem P. Tyto základní typy produktů mohou být obohacené například o betaglukan (TG a PG) (Podhorná, 2007).

V Evropě se vyskytuje několik velkých výrobců gemmoterapeutik, kteří distribuují i do USA (Hubele, 2016).

3.1.5. Gemmoterapeutika z pupenů využívaných i v praktické části práce

1. Jeřáb arónie (*Aronia melanocarpa*)

V lidovém léčitelství byl hojně zastoupen již v historii. Černá jeřabina je považována za velmi cenné ovoce, které snižuje krevní tlak, tlumí bolest, zlepšuje metabolismus, zlepšuje pevnost a pružnost cév, harmonizuje činnost štítné žlázy a je vhodná i pro diabetiky. Mnoho studií prokázalo příznivé účinky arónie u častých komorbidit, jako je dyslipidémie, hypertenze, obezita, prozánětlivé stavy, riziko trombózy atd. Aronie má pravděpodobný potenciál inhibovat rozvoj různých typů rakoviny, včetně leukémie, rakoviny prsu a střev a také rakovinných kmenových buněk. V dnešní době se pro podpůrné účinky používají ve stále větší míře i pupeny, které obsahují cenné účinné látky příznivě působící na celkovou kondici organismu (Podhorná, 2021; Sidor, 2019).

2. Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*)

Výborný lék proti dně, protože výrazně snižuje urikémii, což je hladina kyseliny močové v krvi. Jasan je známý svým protivirovým působením, jeho užívání je vhodné zejména v podzimním a zimním období. Je též dobrým lékem při chřipkách a různých virózách. Bylo zjištěno i protirevmatické působení (Maghsoudi & Haj-allahyari, 2018; Podhorná, 2016; Zentrich, 2007).

3. Ostružiník křovitý (*Rubus fruticosus*)

Ostružiník působí antiskleroticky a antidegenerativně. Léčí fibromy nejrůznější lokalizace a pomáhá i v léčbě dny a revmatismu. Při léčbě osteoporózy a artrózy, zejména u starších žen, je vhodná kombinace s maliníkem a sekvojí. Jeho kořeny se také používají k léčbě průjmu a porodních bolestí. Odvar z kořenů má tonizační a hojivé vlastnosti (Zentrich, 2007; Yousefbeyk et al, 2021).

4. Líška obecná (*Corilus avellana*)

Působí jako antisklerotikum. Líška pomáhá udržovat čisté dobře průtočné cévy, spolu s rozmarýnem urychluje jaterní rekonvalescenci a pomáhá při doléčení po virové žloutence. Obnovuje pružnost plic a je jedním z nejlepších léků na rozedmu plic a na bronchiektázii. Pomáhá udržovat normální krevní tlak, napomáhá ke zředování zahuštěné krve. Její aplikace je rovněž vhodná při neurovegetativní dystonii (psychická labilita). Díky svému fytochemickému obsahu

funguje Líska obecná jako protirakovinné léčivo (Gallego et al, 2017; Zentrich, 2007; Podhorná, 2016).

5. Olše lepkavá (*Alnus glutinosa*)

Posiluje obraný systém celého organismu. Olše je mimořádně vhodné antirevmatikum, které zmírňuje i nejtěžší formy revmatoidní artritidy. Podporuje zdravou srdeční činnost, působí proti srážení krve v žilách. Podporuje správnou funkci kloubů i kostní tkáň a příznivě ovlivňuje osteoporózu. Zabraňuje tvorbě srůstů po operacích, po zánětech pohrudnice, pobřišnice a zánětu plic. Je také vhodné fytopreventikum infarktu myokardu při probíhající ischemické chorobě srdeční. Léčí hluboké poškození tkání. Tinktura z listů působí protizánětlivě při onemocnění v krku, stěv, také při revmatismu a dně. Bylo prokázáno, že n-heptanový extrakt z olše vykazuje antiparazitární aktivitu proti infekci *Toxoplasma gondii* (Mushkina, 2021; Darne et al, 2021; Podhorná, 2016; Zentrich, 2007).

6. Topol černý (*Populus nigra*)

Urychluje rekonvalescenci s ještě přetrvávajícími zbytky nežádoucích virů a bakterií v organismu. Tlumí svalové křeče a degenerativní procesy v tkáních. Harmonizuje činnost vegetativního nervstva a optimalizuje kvalitu krve. Několik studií popisuje jeho antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antifungální, protinádorové, antidiabetické vlastnosti a také jeho účinky na produkci melaninu. Pupenu z topolu černého jsou zdrojem důležitých bioaktivních látek, které jsou odpovědné za širokou škálu terapeutických použití (Kis et al, 2020; Nassima et al, 2019; Podhorná, 2016).

7. Ptačí jeřáb (*Sorbus aucuparia*)

Podporuje udržování hormonální rovnováhy u žen. Normalizuje menstruační cyklus. Jeřáb podporuje plodnost, udržuje klimakterium a pomáhá udržovat zdravý stav ženských orgánů. Jeho semena obsahují zdroje přírodních antioxidantů. Dále se používá jako močopudná, projímavá látka. Také jako látka proti revmatismu, ledvinovým chorobám, k léčbě různých poruch související s gastrointestinálním a respiračním traktem (Sarv et al, 2021; Podhorná, 2016).

8. Vrba bílá (*Salix alba*)

Gemmoterapeutikum z vrby je výborným léčivem při chřipce, chronických a akutních zánětech, infekcích, bolestech a horečkách. Další využití vrby se nabízí při revmatismu a pozitivně ovlivňuje také močové a trávicí ústrojí, a to často při kombinaci s olší. Extrakty z vrby bílé mají neuroprotektivní účinky, čímž snižují dráždivost nervové soustavy, a tím vnímavost organismu ke slabším bolestivým nebo jinak obtěžujícím vjemům. V tomto případě je vhodné kombinovat s měsíčkem (Giacomo et al, 2019; Maistro, 2020; Podhorná, 2016; Zentrich, 2007).

9. Javor babyka (*Acer campestre*)

Tradičně se používá při léčbě různých zánětlivých onemocnění, zejména hemeroidů a revmatismu. Javor babyka také posiluje nervový systém, příznivě působí při bolestech nervového původu, napětí v hlavě a při závratích. Posiluje celkovou hybnost organismu. Podporuje funkci nervů, psychickou rovnováhu a pozitivně působí na cévní systém (Şen Utsukarçi et al, 2020; Podhorná, 2016).

10. Ostružiník maliník (*Rubus idaeus*)

Maliník upravuje ovariální hormonální sekreci a má podobný účinek jako ženské hormony. Používá se pro úpravu endokrinní rovnováhy, často v kombinaci s černým rybízem. Ve stejné kombinaci působí proti ovariálním cystám, menstruačním poruchám a tlumí poševní záněty. V kombinaci se sekvojí udržuje zdravý stav kloubů a kostí. Extrakty z divokého maliníku mají také antioxidační, protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti (Veljkovic et al, 2019; Szymanowska et al, 2018; Podhorná, 2016; Zentrich, 2007).

11. Černý rybíz (*Ribes nigrum*)

Černý rybíz je antialergikem používaným při senné rýmě, ekzému a astmatu. Zvláště vhodná je kombinace s pupeny šípkové růže a kaliny. V této kombinaci patří černý rybíz mezi neúčinnější přírodní léčiva vůbec. Výborné výsledky přináší například při léčbě adenomu prostaty starších mužů, a to buď sólově, nebo v kombinaci s pupeny sekvoje. Můžeme ho podávat při potřebě kortizonového efektu, např. při snížené funkci nadledvinek nebo při těžších formách zánětů. V kombinaci s pupeny ostružníku a maliníku léčí vaječnickové cysty, společně s pupeny borovice sosny příznivě ovlivňuje stařeckou artrózu. Harmonizuje činnost žláz s vnitřní sekrecí. Pomáhá udržovat normální krevní tlak, působí proti únavě i proti migrénám. Dále může působit jako dobré obecné stimulant v rekonvalescenci po infekčních chorobách nejrůznějšího typu. Lék z černého rybízu zvyšuje odolnost proti chladu, má výraznou edémovou aktivitu, velice výrazně snižuje počet zánětlivých buněk. Jde tedy o přípravek, který má širokou škálu využití jak v léčbě chorob alergických, revmatických a plicních, ale také v dermatologii a v otorhinolaryngologii (Podhorná, 2016; Zentrich, 2007).

12. Jírovec maďal (*Aesculus hippocastanum*)

Tinktura z pupenů jírovce maďalu má blahodárné působení na cévy a kapiláry a na krevní oběh v končetinách. Příznivě ovlivňuje cirkulaci krve v plicích a celkově zlepšuje kvalitu cévních stěn a periferního prokrvování. Dále podporuje výživu tkání, zejména pokožky vlasů, nehtů, pročišťování pokožky. Udržuje pohyblivost a pružnost kloubů, tlumí menstruační bolesti a menopauzální projevy. Je vhodným podpurným prostředkem při výskytu hemeroidů a křečových žil. Celkově posiluje fyziologické odolnosti vůči nepříznivým okolním podmínkám (Podhorná, 2016).

13. Lípa srdčitá (*Tilia cordata*)

Bylinné nálevy z lípy srdčité jsou mezi lidmi běžnou praxí. Antioxidanty posilují imunitní systém, snižuje riziko rakoviny a infekcí, jako je například nachlazení. Extrakty tilia mají několik farmakologických účinků včetně hepatoprotektivních, sedativních, anxiolytické, protinádorové a protizánětlivé. Lípa tedy uvolňuje stavy úzkosti a povzbuzuje dobrou náladu. Tlumí pocity svědění i podráždění nervového původu. Tinktury z pupenů lípy mají blahodárné účinky na dýchací systém, podporu obranných reakcí organismu, zklidnění a optimální relaxaci a spánek. V kombinaci s bělotrnem posiluje nervovou soustavu (Cittan et al, 2018; Podhorná, 2016).

14. Bříza bělokorá (*Betula pendula*)

Bříza bělokorá byla tradičně využívána v mnoha zemích pro různé léčebné účely. *Betula pendula* se používá k léčbě kožních onemocnění, zejména ekzémů, infekcí, zánětů, revmatismu a močových poruch. Olej z pupenů je také široce používán jako tonikum a jako antiseptikum v kosmetických přípravcích, zejména vlasových. Başer a Demirci (2007) prokázali potenciál několika druhů *Betula* s antifungálními, antibakteriálními a antioxidačními účinky. Bříza dále stimuluje jaterní funkce a činnost slinivky. Považuje se za přípravný prostředek k vlastnímu užívání pro svoji silnou čistící schopnost (Azman et al, 2016; Başer & Dermici, 2007; Podhorná, 2016).

15. Jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*)

Jinan je moderní lék nejnovější generace. Listy *Ginkgo biloba* jsou jedním z populárních bylinných léků a jsou zaznamenány v čínském lékopisu (vydání 2015). Listy jinanu jsou dobře známé u hypertenze, ischemického myokardu a mozkové ischemie. Extrakty z *Ginkgo biloba* jsou užívány jako doplněk stravy u starší populací ke zlepšení paměti a ztrátě kognitivních funkcí související s věkem. Gemmoterapeutikum lze využívat především k prevenci i k léčení následků náhlých příhod mozkových, náhle vzniklé hluchoty i postupného ztrácení sluchu, tinnitu (šumění a praskání v uchu). Zlepšuje také ischemii dolních končetin, léčí bronchitidu, dále také ovlivňuje parkinsonický třes, závratě a psychogenní a cévní bolesti hlavy (Singh, 2019; Liu, 2020; Podhorná, 2016; Zentrich, 2007).

3.1.6. Biochemická analýza pupenů

Aktivita pupenů je řízena především pěti skupinami rostlinných hormonů: auxiny, gibbereliny a cytokininy, které převážně řídí růst a dále inhibiční fytohormony, kyselinu abscisovou a etylenem (Chrischta & Luis, 2021).

Auxiny jsou první rostlinné hormony, které byly objeveny v roce 1926. Mezi jejich základní funkce patří např., že povzbuzují růst rostliny do délky a výšky, povzbuzují buněčné dělení a buněčnou diferenciaci, jsou důležité při zacelování ran a zpomalování procesu stárnutí. Dále podporují korelační vztah mezi vrcholovým pupenem rostliny a pupeny postranními, u

nadzemních částí rostliny zprostředkovávají schopnost rostliny otáčet se ke světlu (fototropismus) a orientaci kořenů podle gravitace (gravitropismus) (Chrischta & Luis, 2021).

Gibereliny byly také objeveny v roce 1926, krátce po auxinech. Mezi jejich účinky patří např. stimulují výstavbu meristemické tkáně, povzbuzují klíčení, ovlivňují rozkvet květních pupenů a jsou zodpovědné za diferenciaci pohlaví samičích květů (Chrischta & Luis, 2021).

Cytokininy byly objeveny v roce 1940 a svými účinky se podobají auxinům. Mezi jejich funkce patří např. povzbuzují látkovou výměnu mladých výhonků rostlin, povzbuzují buněčné dělení, podporují růst do délky a výšky, stimulují produkci chlorofylu a zpomalují proces stárnutí rostliny (Chrischta & Luis, 2021).

Kyselina abscisová byla objevena v roce 1963 a dříve se označovala jako „dormin“. Její účinky jsou např: navozuje klidový stav semen, pupenů a dalších částí rostliny a udržuje je ve vzpřímené poloze, zvyšuje efektivitu využití vody v případě sucha nebo v rámci obranných mechanismů rostliny (Chrischta & Luis, 2021).

Ethylen má následující funkce. Povzbuzuje rozvoj květu, podmiňuje zrání plodů, povzbuzuje padání listů a podporuje umírání jednotlivých částí rostlin (Chrischta & Luis, 2021).

3.1.7. Účinné látky v léčivých rostlinách

Pokusy porozumět antimikrobiálnímu účinku léčivých rostlin a přesným mechanismům účinku jsou zpomalovány dvěma hlavními překážkami. Za prvé, antimikrobiální účinek je výsledkem kombinovaného působení několika faktorů, u nichž některé nemají přímý antimikrobiální účinek, ale hrají zásadní roli při dosažení terapeutického účinku. Za druhé, u velké většiny léčivých rostlin mají aktivní sloučeniny kromě antimikrobiálního účinku i další účinky, například protizánětlivý účinek. Zejména gemmoterapie uvádí, že všechny aktivní složky v kmenových tkáních embryonálních buněk působí koordinovaně, takže pokoušet se dělit celý účinek je zbytečné. I tak je identifikace terapeuticky účinných látek za účelem získání čisté sloučeniny povinná pro další experimentální testy a klinické studie (Ionescu, 2017).

Sledování spojení mezi aktivními sloučeninami a jejich degradačními produkty je problém náročnější než izolace čisté sloučeniny a stanovení struktury čisté látky. V současné době existují metodologie extrakce a přesné protokoly pro analýzu fyzikálně-chemických vlastností čistých látek, ale zvažování všech možných propojení je mnohem složitější. Léčení je výsledkem celé sítě látek, proto velmi často není dobře pochopen mechanismus působení rostlinných produktů. To, co je skutečně nezbytné, jsou proveditelné protokoly pro biotest reakčního řetězce mezi aktivními sloučeninami. Pokrok v rozpoznání terapeutického účinku rostlinných produktů začíná přesnou charakterizací účinných látek. Pokroky dosažené v nanotechnologiích jsou povzbudivé ve směru vývoje účinnějších, stabilnějších a ovladatelnějších přípravků rostlinného

původu. V blízké budoucnosti mohou nanočástice najít okamžité uplatnění při kontrole vedlejších účinků, například toxicity, některých léků používaných k léčbě infekčních onemocnění (Ionescu, 2017).

1. **1,8-cineol** ($C_7H_{18}NO_3S^+$) se nachází v mnoha esenciálních olejích, např. *Eucalyptus globulus* (eukalyptový olej, *Melaleuca alternifolia* (čajovník) popř. *Rosmarinus officinalis* (rozmarýn). Je to jedna z hlavních účinných látek, což vysvětluje antimikrobiální účinnost esenciálních olejů (Ionescu, 2017).
2. **Antokyany** (Kyanidin: $C_{15}H_{11}O_6Cl$; Peonidin: $C_{16}H_{13}O_6Cl$; Malvidin: $C_{17}H_{15}O_7Cl$; delphinidin: $C_{15}H_{11}O_7Cl$; Petunidin: $C_{16}H_{13}O_7Cl$; pelargonidin: $C_{15}H_{11}O_5Cl$ nebo $C_{15}H_{11}O^+$) se nacházejí ve *Vaccinium myrtillus* (borůvka). Nedávná studie o střevní dostupnosti a biologické dostupnosti ukazuje, že tlusté střevo je významným místem pro antokyany a produkty jejich degradace (Ionescu, 2017).
3. **Arbutin** ($C_{12}H_{16}O_7$) se nalézá v rostlinách z čeledí *Ericaceae*, *Asteraceae* a *Rosaceae*. Vysvětluje antiseptické vlastnosti, ale jeho vztah k mikroorganismům není dostatečně prozkoumán, zejména mutagenní účinek jeho metabolitů hydrochinonu (Ionescu, 2017).
4. **Allicin** ($C_6H_{10}OS_2$) nalezený v rodině *Alliaceae*, má široké spektrum antimikrobiální a imunomodulační aktivity spolu s mnoha dalšími příznivými účinky na lidské zdraví (Ionescu, 2017).
5. **Artemisinin** ($C_{15}H_{22}O_5$) je jednou z nejslavnějších polosyntetických sloučenin rostlinného původu používaných při infekčních chorobách. Objev artemisininu a jeho aktivní sloučeniny *Artemisia annua* (pelyněk pravý) přinesl novou naději pro lékařskou komunitu. Vznik rezistence na artemisinin *Plasmodium falciparum* vysvětluje kritickou potřebu identifikovat nová antimalarika (Ionescu, 2017).
6. **Kyselina benzoová** ($C_7H_6O_2$), nalezená v plodech *Vaccinium vitis-idaea* (brusinka nebo medvědice), má antiseptický účinek, který vysvětluje konzervaci džemu (Ionescu, 2017).
7. **Kurkumin** ($C_{21}H_{20}O_6$), což je aktivní sloučenina extrahovaná z aromatických *Curcuma aromatica* (divoká kurkuma), je nejen silný antioxidant, protizánětlivá a protirakovinná složka, ale má také antiparazitickou aktivitu, in vitro studie prokázaly antimalarickou, antileishmaniální a antitrypanosomální aktivitu (Ionescu, 2017).
8. **Éterické oleje** jsou oleje sestávající z komplexní směsi mnoha těkavých sloučenin. I když chybí výzkum mechanismu jejich účinku, jejich antimikrobiální účinnost je prokázána výsledky jejich použití u infekčních onemocnění (Ionescu, 2017).
9. **Chinin** ($C_{20}H_{24}O_2N_2$) pochází z *Mochna*. Po desetiletí byl hlavním lékem na malárii, svou hodnotu prokázaly i další účinné látky rostlinného původu (Ionescu, 2017).

10. Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$) je známý pro své antioxidační vlastnosti, ale také má antimikrobiální činnost (Ionescu, 2017).

11. Thymochinon ($C_{10}H_{12}O_2$) je hlavní účinná látka *Nigella sativa L.* esenciální oleje ze semen. Má nejen protizánětlivý účinek, ale je to všestranný imunomodulátor, nové mechanismy byly nedávno objeveny. Úloha v aktivaci buněčné imunity stimulací CD4+ T lymfocytů a produkcí interferonu γ vysvětlují pozitivní výsledky *Nigella sativa L.* esenciální oleje ze semen při virových infekcích (Ionescu, 2017).

3.1.8. Výhody gemmoterapie

Mezi výhody léčby pomocí bylin, které uvádí Mgr. Jarmila Podhorná ve své knize patří:

- léčbu lze aplikovat u každé nemoci a za každého stavu
- byliny můžeme použít i v případě, kdy přesně nevíme, o jakou jde nemoc
- můžeme ji použít i v případě, kdy nelze použít silné léky
- byliny obsahují potřebné látky pro tělo (vitamíny, hormony, stopové prvky)
- je to nejlepší prevence (trvá déle, než byliny zapůsobí) (Podhorná, 2015).

Gemmoterapeutická léčba nemá vedlejší nežádoucí účinky a nezanechává v těle žádný „odpad“. Je tedy považována za šetrnou k organismu a v dlouhodobějším používání velice účinnou. Je účinná jak při léčení konkrétních nemocí, tak i jako preventivní a podpůrný prostředek pro zdravého člověka (Podhorná, 2015).

Pupeny obsahují zárodečnou tkáň rostlin, ve které je obsaženo to nejcennější, co rostlina potřebuje pro svůj další růst. V pupenech je tedy obsaženo mnohem víc účinnějších látek, než jaké se nachází v částech dospělé rostliny a tím pádem poskytují silnější účinek (Tetau, 2013; Podhorná, 2015).

3.1.9. Budoucnost gemmoterapie

Gemmoterapii používáme jako běžnou součást našich životů, aniž bychom si to vlastně uvědomovali. Setkat se s ní můžeme např. při přípravě kvalitních čajů, během konzumace bambusových výhonků či klíčků atd., zkrátka u všeho, co obsahuje zárodečné tkáně. Dr. P. Henry studoval asi 50 druhů pupenů, což je jen malá část stromů a keřů rostoucích na celém světě (Andrienne, 2007).

Skvělých vlastností gemmoterapie lze využít i v dalších oblastech života. V potravinovém průmyslu mohou tinktury z pupenů sloužit jako ingredience v mnohých potravinových doplňcích a tzv. potravinách nového typu (novel foods). Výtažky z pupenů se dá obohacovat březová míza a také jsou nedílnou součástí hořcového piva (Andrienne, 2007).

Gemmoterapie se dále využívá v kosmetickém průmyslu. Několik firem prodává kosmetické výrobky na bázi nukleových kyselin, vyrobené z výtažků pupenů vinné révy a buku. Z černého rybízu se dělají např. zvláštní výtažky za účelem získání koncentrovaného aroma, které se používá v parfumerii (Andrienne, 2007).

Podle Adrienne se bude gemmoterapie do budoucna zabývat především léčbou nemocí skrze psychiku. Věří, že má pupen potenciál v psychicko-emocionální oblasti jedince. Na podobném principu pracuje např. květové esence Dr. Bacha (Andrienne, 2007).

3.2. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BRs) jsou skupinou steroidních rostlinných hormonů, které jsou nezbytné pro vývoj a růst rostlin (Zicong, & Yuehui, 2020). Brassinosteroidy jsou považovány za rostlinné hormony, které patří do třídy přirozeně se vyskytujících polyhydroxylovaných sterolových derivátů přítomných ve všech rostlinných druzích a sdílejí strukturní podobnost s živočišnými a hmyzími steroidními hormony (Siddiqui et al, 2018). Jsou široce rozšířeny v rostlinách a jejich přítomnost byla potvrzena i u řas, mechů a cévnatých rostlin (Chmur, & Bajguz, 2021). BRs podporují buněčnou expanzi a buněčné dělení a hrají roli v etiolaci a reprodukci, modulaci genové exprese, zrání a stárnutí rostliny. Navíc BRs významně zlepšují účinnost transpirace a způsobují zvýšení obsahu chlorofylů, sacharidů a bílkovin (Chmur, & Bajguz, 2021; Zicong, & Yuehui, 2020). Také regulují různé procesy, jako je prodlužování buněk a fotomorfogeneze, hrají důležitou roli v diferenciaci xylému (Nolan et al, 2020). Podílejí se na regulaci vývojových procesů např. růst kořenů a výhonků, vaskulární diferenciaci, plodnost, kvetení a klíčení semen. Velké množství studií ukazuje, že BRs mohou pozitivně ovlivnit reakce rostlin na biotické i abiotické stresy, jako je teplo, sucho, chlad, slanost, těžké kovy i pesticidy (Ahammed et al., 2020).

Brassinosteroidy byly objeveny v roce 1970 při zkoumání více než 30 druhů pylových extraktů panem Johnem Mitchellem a jeho spolupracovníky. Protože tento extrakt podporující růst byl izolován z řepky olejné *Brassica napus*, byl pojmenován jako „brassins“ a později byla bioaktivní forma rozpoznána jako brassinolid, což je nejaktivnější forma BRs. Brassinolid (BL) je přítomný v každé části rostliny, jako je kořen, list, výhonek, pyl, květ, semeno a cévní kambium. BRs mění transportní systém auxinu a hrají nepřímou roli v dálkové signalizaci v rostlinách. Jedním z nejdůležitějších procesů ovlivněných díky BRs je fotosyntéza, na které závisí celkový růst rostliny. (Chmur, & Bajguz, 2021; Siddiqui et al, 2018).

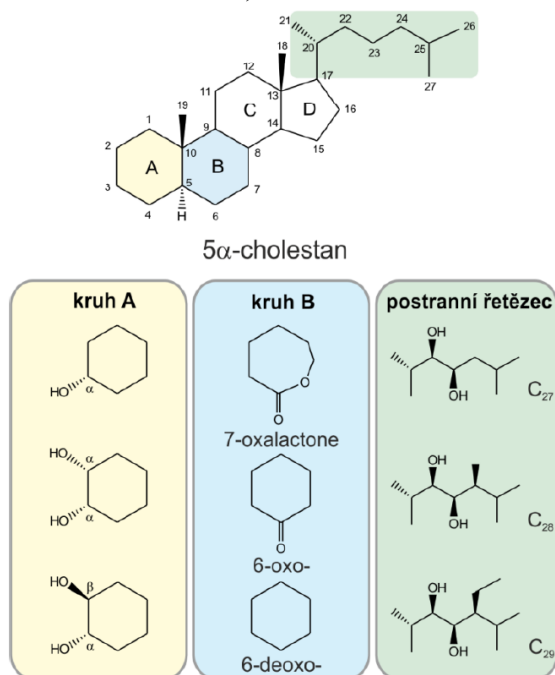
3.1.1. Biosyntéza rostlinných sterolů a BRs

Rostlinné steroly neboli fytosteroly jsou velmi důležitou rodinou přírodních látek, které zastávají v rostlinách mnoho biologických funkcí. Už od 50. let 20. století je známo, že jsou velmi prospěšné pro člověka, jelikož jsou schopny snižovat hladinu cholesterolu v těle, jsou-li

konzumovány v množství nad 1 g denně. Fytosteroly mohou také působit jako prekurzory pro de novo biosyntézu steroidních hormonů (Piironen et al, 2000; Tarkowská, 2019).

Obecně jsou steroly tetracyklické C₃₀ isoprenoidní látky patřící do skupiny triterpenoidů, které vznikají kondenzací základních pětiuhlíkových stavebních jednotek izoprenu ve formě isopentenylidifosfátu (IPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP). U vyšších rostlin existují dvě cesty k produkci terpenoidů – mevalonátová cesta (MVA) a 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátová cesta (DOXP), cesty jsou pojmenované podle prvního vytvořeného meziprojektu. Dráhy působí v cytosolu nebo v plastidech ve většině eukaryotických fotosyntetických organismů, ale ne u zvířat (Tarkowská & Strnad, 2018; Tarkowská, 2019).

Podle počtu atomů uhlíku v molekule se steroly dělí na C₂₇, C₂₈ a C₂₉. Cholesterol je C₂₇ sterol a slouží jako prekurzor signálních molekul brassinosteroidů, fytoekdysteroidů a také pohlavních hormonů androgenního a estrogenního typu u živočichů. Rozdíly ve struktuře těchto hormonů jsou způsobeny typem a orientací okysličených funkcí a A- a B- kruhu a také počtem a polohou funkčních skupin v postranním řetězci molekuly. Tyto modifikace vznikají během oxidačních a redukčních reakcí. Na základě postranního řetězce cholesterolu (CR) jsou BRs rozděleny různými substituenty na C-23, C-24, C-25, 23-oxo, 24S-methyl, 24R-methyl, 24-methylen, 24S-ethyl, 24-ethyliden, 24-methylen-25methyl, 24-methyl-25-methyl; bez substituentu na C-23, bez substituentu na C-24 a bez substituentů na C-23, C-24. BRs mohou také konjugovat s glukózou a mastnými kyselinami (Obr. 1; Bajguz, A. et al., 2020; Chmur & Bajguz, 2021; Tarkowská, 2019; Tarkowská et al, 2016).



Obr. 1: Struktura 5 α -cholestanu a různých substituentů na kruhu A a B na vedlejším řetězci přirozeně se vyskytujících brassinosteroidů (převzato z Tarkowská et al. 2016).

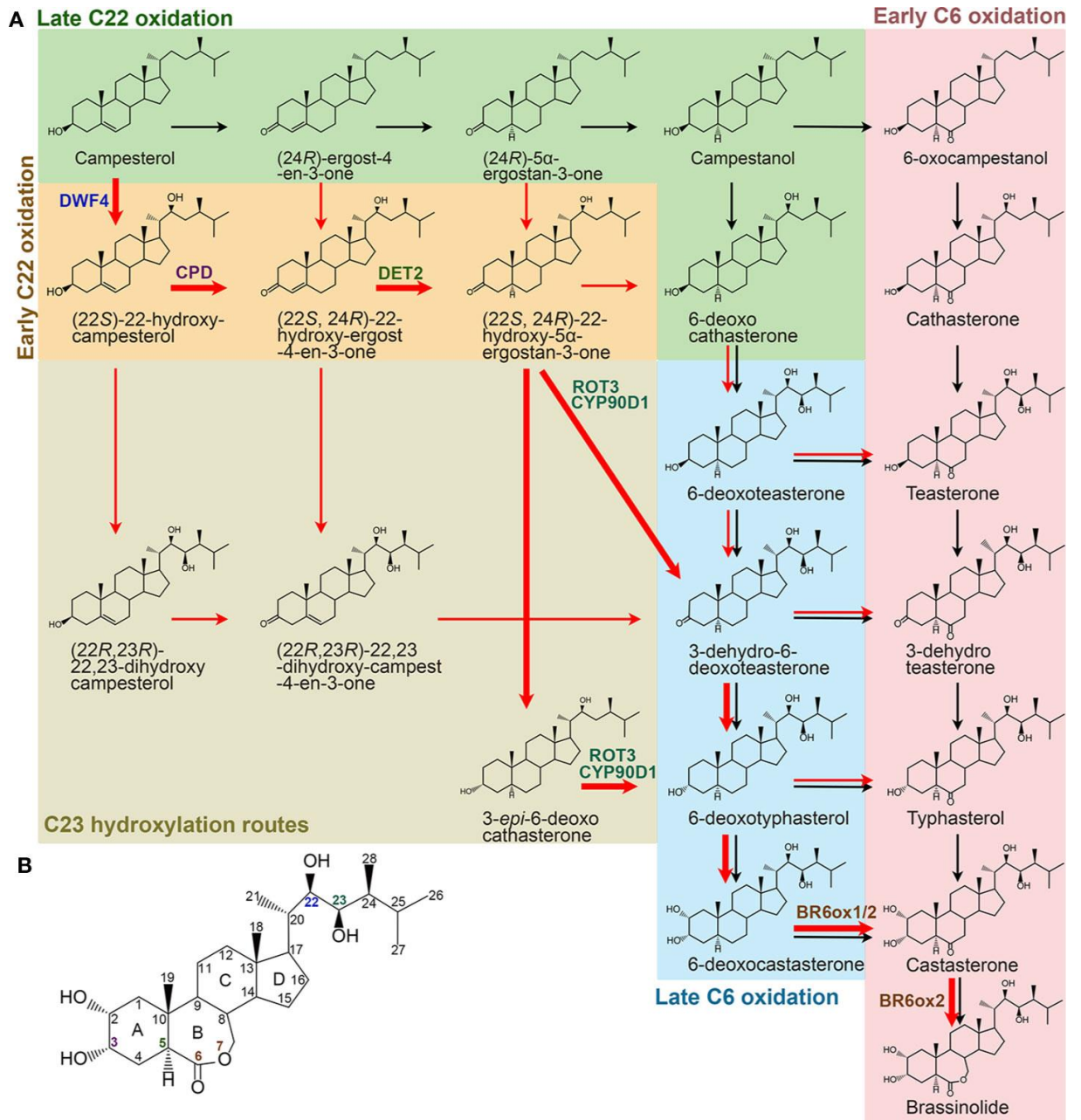
Cesta rostlinných sterolů se skládá ze sekvence více než 30 enzymaticky katalyzovaných kroků, které probíhají v rostlinných membránách. Klíčovým meziproduktem v biosyntéze rostlinných sterolů je lineární C₃₀ uhlovodík skvalen. Ten podléhá cyklizaci za vzniku C₃₀ Δ²⁴ sterol cykloartenolu ve fotosyntetických rostlinách. Houby bez fotosyntetického aparátu přeměňují skvalen na lanosterol a nakonec na ergosterol (Tarkowská, 2019; Janeczko & Skoczowski, 2005; Hartmann, 1998; Wei & Li, 2020).

Další alkylační reakce cykloartenolu ve fotosyntetických rostlinách vedou k syntéze prvních fytosterolů, jako je cholesterol (C27), kampesterol (C28) a sitosterol (C29). Tyto fytosteroly jsou výchozími body pro biosyntézu rostlinných steroidních signálních molekul fytoekdysteroidů a rostlinných steroidních hormonů brassinosteroidů a také progesteronu, testosteronu a jeho derivátů (Tarkowská, 2019; Wei & Li, 2020).

Biosyntéza BRs byla objasněna kombinací genetických přístupů, záchrannými experimenty mutantů s domnělými prekurzory, analýzou meziproduktů a testy enzymatické aktivity. Biosyntéza BRs zahrnuje paralelní a vysoce propojené dráhy (viz. Obr. 2). Campesterol může být nejprve přeměněn na campestanol (CN) prostřednictvím pozdní oxidační cesty C-22. CN je přeměněn na castasteron (CS) buď prostřednictvím časně oxidační cesty C-6 nebo pozdní oxidační dráhy C-6, která se také nazývá dráha závislá na CN. Na druhé straně může být campesterol nejprve přeměněn na 6-deoxocasteron prostřednictvím časně oxidační cesty C-22, buď přímo, nebo prostřednictvím hydroxylačního reakčního kroku C-23. Poté přejde do oxidační dráhy C-6 za účelem syntézy CS, která je označována jako CN- nezávislá dráha. CS je koncová a bioaktivní sloučenina BRs v rostlinách trávy nebo např. rýže. Zatímco CS může být dále přeměněn na brassinolid (BL), ve většině dvouděložných rostlin se v důsledku duplikace genu C-6 oxidázy vyvinula funkce BL syntázy. Ve srovnání s jejich paralelními větvemi se zdá, že časná oxidační dráha C-22 a pozdní oxidační dráha C-6 jsou převládající cestou u mnoha rostlinných druhů, včetně *Arabidopsis*, rajčat a hrachu. Ačkoli existují dva další kroky v jiných biosyntetických cestách ve srovnání s touto dominantní cestou nezávislou na CN, všechny cesty biosyntézy BRs zahrnují společné reakční kroky, včetně hydroxylace na C-22, C-23 a C-2, oxidace a redukce na C-3, redukce na C-5 a oxidace na C-6 a další Baeyer-Villigerova oxidace u většiny dvouděložných rostlin (Wei & Li, 2020; Rozhon & Akter, 2019; Yuhee & Sungwa, 2013).

V časně C-6 oxidační dráze probíhá oxidace C-6 před hydroxylací C-22 zprostředkovanou DWF4. Bylo zjištěno, že *Arabidopsis* CYP85A1 a CYP85A2 katalyzují oxidační reakci C-6. Oba tyto enzymy převádějí 6-deoxoTY a 6-deoxoCS na typhasterol (TY) a CS. Ukázalo se, že CYP85A2 katalyzuje dvě po sobě jdoucí reakce, převádí 6-deoxoTY na BL prostřednictvím CS. Zdá se, že tyto dva enzymy působí pouze na následné sloučeniny, jako je 6-deoxoTY a 6-deoxoCS. Ztráta funkce těchto enzymů vede k podobným defektním fenotypům,

včetně zakrslé a kompaktní architektury rostlin, krátkých kořenů, opožděné doby kvetení, snížení biomasy a výnosu semen. Ačkoli genetické a biochemické přístupy identifikovaly mnoho enzymů zapojených do biosyntézy BR, několik jich zbývá určit (Obr. 2; Yuhee & Sungwa, 2013; Wei & Li, 2020).



Obr. 2: Specifické biosyntetické dráhy BR z kampesterolu ve vyšších rostlinách (Převzato z: Wei & Li, 2020).

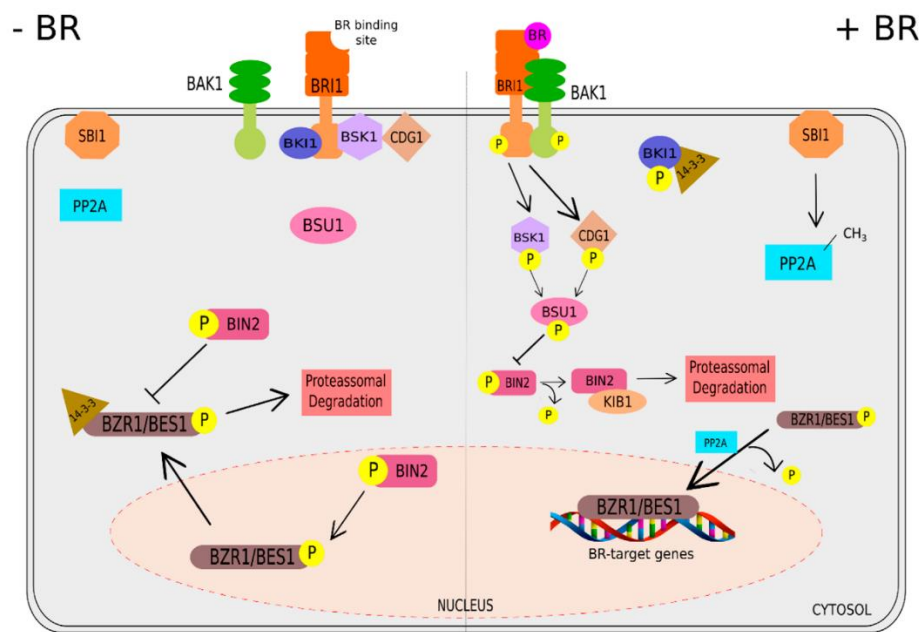
3.2.1. Signální dráha BRs

Signální dráhou rozumíme komunikaci mezi buňkami s cílem regulace vývoje buněk, růstu nebo dělení. Pro takovou komunikaci je nutný receptor, který je umístěný buď na povrchu buňky, v cytoplasmě nebo membráně (Peres et al, 2019).

V předchozích letech se pomocí kombinace genetických, biochemických a proteomických přístupů urychlilo pochopení signální dráhy BRs u *Arabidopsis*. Clouse et al. v roce 1996 poprvé identifikovali součásti signální dráhy brassinosteroidů v rostlině *Arabidopsis* pomocí mutantů, kteří vykazovali normální prodloužení kořenů i v přítomnosti vysoké koncentrace BL (brassinolid). Po navázání BR na BRI1 (brassinosteroid insensitive 1), plazmatická membránová na leucin bohatá repetice (LRR) receptor-like kinase (RLK), která funguje se svým koreceptorem BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1), generuje fosforylační kaskádu. Aktivace receptoru a koreceptoru stimuluje fosforylaci BKI1, inhibitoru BRI1, což vede k jeho disociaci z plazmatické membrány a další asociaci s proteiny 14-3-3. Proteiny 14-3-3 se účastní interakce a cytoplazmatické retence BZR a BES1. Současně se aktivovaný BRI1 podílí na fosforylaci BSK (BR-signaling kinase 1) a CDG1 (constitutive differential growth 1), které oba následně aktivují fosfatázu BSU1 (BRI1 suppressor 1). BSU1 je zodpovědný za defosforylaci BIN2 (brassinosteroid-intensive 2), kinázy podobné GSK3 a hlavního represoru signální dráhy BR, která je potlačena KIB1 (kink suppressed in BZR1-1D), F-boxem ubikvitin ligázy, která neumožňuje asociaci BIN2 s BZR1/BES1, což vyvrcholí jeho ubikvitinací a degradací. Po inaktivaci BIN2 jsou BZR1 a BES1 rychle defosforylovány PP2A (fosfatáza 2A) a následně disociovány z 14-3-3 proteinů, což způsobuje jejich akumulaci v jádře a vede k regulaci mnoha genů reagujících na BRs (Obr. 3, Clouse et al. 1996; Peres et al, 2019; Clouse, 2011).

V nepřítomnosti BR se BKI1 váže na intracelulární doménu BRI1, čímž brání jeho asociaci s jeho korepresorem BAK1. Na druhé straně je aktivován BIN2 a 14-3-3 proteiny s BZR1 a BES1, čímž si udržují svou defosforylovanou formu a blokují jejich schopnost přepravy do jádra pro regulaci tisíců genů reagujících na BRs (Obr. 3, Peres et al, 2019; Zhu et al, 2017).

Za zmínku určitě stojí to, že předchozí studie ukázaly, že BR zvyšuje expresi SBI1 (suppressor of BRI1), pozitivního regulátoru degradace BRI1, který methyloje PP2A a řídí jeho subcelulární lokalizaci spojenou s membránou. Přemístění methylovaného PP2A na membránách jako takové usnadňuje jeho spojení s BRI1 aktivovaným BR, což vede k defosforylaci a degradaci BRI1 a následně k ukončení signalizace BR. Tato data naznačují, že PP2A a ABI1 poskytují mechanismus negativní zpětné vazby, který spouští obrat BRI1 po aktivaci signální dráhy BR (Peres et al, 2019; Wu et al, 2011).



Obr. 3: Model signální dráhy v přítomnosti a nepřítomnosti brassinosteroidů (BR) u *Arabidopsis*. (Převzato z Peres et al, 2019).

3.3. Steroidní hormony

Živočišná a rostlinná říše jsou dva zcela oddělené světy, ale naopak jejich vývoj na této planetě probíhal současně. Proto některé látky syntetizované v přírodě se mohou vyskytovat v rostlinných i živočišných organismech. Některé sloučeniny regulující růst a vývoj rostlin, mohou také řídit procesy diferenciacce a buněčný růst u zvířat a naopak. Příkladem jsou právě steroly a steroidní hormony. Jsou to tetracyklické látky patřící k isoprenoidům. Steroly se vyskytují ve všech eukaryotech, jak rostlinných, tak živočišných, kde hrají mnoho důležitých rolí, např. udržování semipermeability membrán, regulace jejich tekutosti. Také slouží jako biosyntetické prekurzory pro steroidní hormony a hrají roli jako signální molekuly. Typický představitel, který je produkován jak rostlinnými, tak živočišnými buňkami je cholesterol (Tarkowská, 2019; Espenshade & Hughes, 2007; Behmer & Nes, 2003; Tarkowská & Strnad, 2018).

3.3.1. Funkce steroidních hormonů

Androgeny a estrogény jsou u zvířat i lidí pohlavní steroidní hormony s širokou aktivitou, která zahrnuje generativní vývoj a reprodukci. Mezi nejznámější funkce androgenů patří tvorba mužských pohlavních orgánů, vývoj mužských pohlavních znaků (hlas, stavba těla atd.) a jejich anabolické účinky (nárůst svalové hmoty). Estrogény regulují tvorbu ženských pohlavních orgánů a prsů v prenatálním životě a po porodu, formují psychiku, ovlivňují menstruační cyklus, metabolismus lipidů (rovnováha HDL-LDL cholesterolu, vylučování cholesterolu žlučí atd.), metabolismus vápníku a srážlivost krve. Zároveň jsou však estrogény pro svou proliferační

aktivitu spojovány se stimulací některých druhů rakoviny, jako je rakovina prsu (Janeczko, 2021; Riis et al, 2016; Russo, J. & Russo, I. H.,2006)

Progesteron byl po dlouhá léta popisován jen jako savčí gonadální steroidní hormon, který je nezbytný pro pokračování časného těhotenství a hraje důležitou roli při ovulaci a luteinizaci u savců. Jeho přítomnost v rostlinách byla poprvé zpozorována v roce 1964. S vývojem moderních analytických instrumentálních metod, jako je hmotnostní spektrometrie, se přesvědčivě ukázalo, že progesteron je rozhodně v rostlinách přítomen. PRG slouží v rostlinách jako prekurzor při biosyntéze androstanů a estranů. Některé studie ukazují, že jako prekurzor PRG může sloužit i např. sitosterol, kampesterol nebo stigmasterol. PRG má regulační aktivitu, která ovlivňuje jak vegetativní, tak reprodukční vývoj. Dále bylo prokázáno, že tento hormon negativně reguluje prodlužování buněk a stimuluje kořenový gravitropismus. Simon a Greenwich (1989) prokázali poměrně rozšířený výskyt PRG spolu s estrogeny a androgeny. Provedli screening 128 rostlinných druhů z více než 50 čeledí pomocí radioimunoanalýzy a zjistili, že je PRG přítomen asi u 80 % zkoumaných druhů, testosteron a jeho deriváty asi u 70 % druhů a estrogeny asi u 50 % druhů. Androgeny (testosteron a dihydrotestosteron) byly detekovány v semenech všech testovaných druhů. Výsledky ze studií, které jsou založené na hmotnostní spektrometrii Simerský et al (2009) a Lino et al (2007) potvrzují důkazy, že PRG, testosteron a jeho deriváty jsou v rostlinných tkáních přítomny (Tarkowská, 2019; Janeczko & Skoczowski, 2005).

3.1.2. Biosyntéza steroidních hormonů

Estrogeny a androgeny jsou syntetizovány z cholesterolu prostřednictvím pregnenolonu a progesteronu a jsou tvořeny na základě estranového nebo androstanového skeletu. Mezi androgeny je nejznámější sloučeninou testosteron. Do této skupiny patří také 5 α -dihydrotestosteron (DHT), androsteron, dehydroepiandrosteron (DHEA) a 4-androsten-3,17-dion neboli androstenedion. Testosteron a androsteron jsou u lidí a zvířat hlavními prekurzory další skupiny hormonů a to estrogenů. Na této biosyntéze se podílí i enzym aromatáza, která se také nazývá estrogensyntetáza. Estrogeny zahrnují 17 β -estradiol, estron a estriol. Biosyntetická dráha steroidních hormonů je dobře charakterizována u zvířat a lidí. Předpokládáme, že podobná cesta funguje i u rostlin. Na obrázku 5 vidíme strukturu a vzájemnou konverzi pohlavních steroidů (Obr. 4, Chatuphonprasert et al, 2018; Janeczko, 2021).

3. Experimentální část

3.1. Pomůcky a chemikálie

3.1.1. Pomůcky

- Automatické pipety a plastové špičky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Plastové mikrozkušavky Eppendorf
- Skleněné zkumavky
- Stojan na mikrozkušavky
- Plastové mikrofiltry 0,2 μm NY (Chromservis)
- Laboratorní sklo
- LC vialky 2 ml, 9 mm (Chromservis)
- Inserty s kónickým dnem (250 μl , Chromservis)
- SPE kolonky: 50mg Discovery DPA[®]- 6S (Supelco, USA)
100 mg Isolute[®] C4 (Biotage, Švédsko)

3.1.2. Chemikálie

- Acetonitril (Merck KGaA, Německo)
- Methanol (Merck KGaA, Německo)
- Ethanol (PENTA s.r.o., Česká republika)
- Destilovaná voda Milli-Q H₂O (Merck)
- Standardy steroidních hormonů (Merck): progesteron, pregnenolon, pregnandion, testosteron, androstendion, DHEA, estron, 17 β -estradiol
- Standardy brassinosteroidů (OlChemIm s.r.o.): brassinolid, 28-homobrasinolid, 28-norbrassinolid, 24-epibrassinolid, castasteron, 28-homocastasteron, 28-norcastasteron, 24-epicastasteron, teasteron, typhasterol.
- Izotopicky značené interní standardy steroidních hormonů (Merck, Cambridge Isotope Laboratories.): [²H₉]-progesteron, [²H₄]-pregnenolon, [²H₃]-testosteron, [²H₆]-DHEA, [²H₆]-pregnandion, [²H₅]-17 β -estradiol
- Izotopicky značené interní standardy brassinosteroidů (OlChemIm s.r.o.): [²H₃]-brassinolid, [²H₃]-24-epibrassinolid, [²H₃]-28-norbrassinolid, [²H₃]-castasteron, [²H₃]-24-epicastasteron, [²H₃]-28-norcastasteron, [²H₃]-typhasterol

3.1.3. Přístroje

- Analytické laboratorní váhy (Sartorius CPA225D (Sartorius Weighing Technology GmbH, Německo)
- Centrifuga stolní Allerga 64R (Beckman Coulter, USA)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic 310 (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)
- Vortex Mixer – Wizard (VELP Scientifica, Itálie)
- Oscilační mlýn Verder MM 400 (Německo)
- Rotátor SB3 Stuart
- Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich, Supelco, USA)
- Vakuová odparka Centrivap Labconco
- Kapalinový chromatograf Acquity™ Ultra Performance LC (Waters, USA)
- Hmotnostní spektrometr Xevo™ TQ-S (Waters MS Technologies, Velká Británie)

3.1.4. Rostlinný materiál

Pupeny těchto rostlin: (Centrum Naděje Mgr. Jarmily Podhorné, Brodek u Konice, sběr duben 2019)

Pupeny byly po natrhání hluboce zamrazeny pomocí tekutého dusíku a následně lyofilizovány pro dlouhodobé uskladnění (fotografie vybraných pupenů viz příloha Obrázek S1).

- Jeřáb aronie (*Aronia melanocarpa*)
- Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*)
- Ostružina křovitá (*Rubus plicatus*)
- Líska obecná (*Corylus avellana*)
- Olše lepkavá (*Alnus glutinosa*)
- Topol černý (*Populus nigra*)
- Ptačí jeřáb (*Sorbus aucuparia*)
- Vrba bílá (*Salix alba*)
- Javor babyka (*Acer campestre*)
- Ostružiník maliník (*Rubus idaeus*)
- Černý rybíz (*Ribes nigrum*)
- Jírovec maďal (*Aesculus hippocastanum*)
- Lípa srdčitá (*Tilia cordata*)
- Bříza bělokorá (*Betula pendula*)
- Jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*)

3.2. Metody práce

3.2.1. Extrakce vzorků pro analýzu BRs a steroidních látek

Lyofilizované a homogenizované pupeny rostlin byly nejprve naváženy na analytických vahách. Navážky vzorků byly v rozmezí 5-7 mg, od každého vzorku bylo připraveno 5 technických replikátů.

Ke každému vzorku byly přidány 3 keramické homogenizační kuličky a 1,5 ml extrakčního činidla (60% acetonitril). Vzorky byly homogenizovány po dobu 5 minut v extrakčním mlýnu o frekvenci 27 Hz, poté byly dány na 3 minuty do ultrazvukové lázně a extrakce následně probíhala po dobu 12 h při 4 °C, vzorky byly umístěny v rotátoru.

Další den byly vzorky centrifugovány 10 minut, při 5 °C a 20000 rpm. Dále byl odebrán supernatant a ke každému vzorku byla přidána směs deuterovaných standardů BRs nebo steroidních hormonů (25 pmol/vzorek).

3.2.2. SPE purifikace

Postup čištění vzorků na tuhé fázi byl modifikován podle publikace Tarkovská et al, 2016.

Pro SPE purifikace byly použity kolony Discovery DPA[®]- 6S 50 mg. Kolony byly nejprve aktivovány promytím 1 ml 100% MeOH, poté byly ekvilibrovány 1 ml 60% AcCN. Na takto připravené kolony byly následně po 1 ml naneseny vzorky, tato frakce byla sbírána do skleněných zkumavek. Vzorky byly následně odpařeny na rotační vakuové odparce.

Po odpaření byly vzorky rozpuštěny ve 100 µl 100% MeOH, zvortexovány a vloženy na 3 minuty do ultrazvukové lázně. Poté byly vzorky doplněny do 1 ml redestilovanou H₂O. Pro další krok čištění byly použity kolony Isolute[®] C4 100 mg. Následovala aktivace kolon pomocí 1 ml 100% MeOH, ekvilibrace 1 ml 10% MeOH a nanesení vzorků. Po prokapání vzorku byly kolony promyty 1 ml 10% MeOH a poté proběhla eluce navázaných analytů 1 ml 100% MeOH, tato frakce byla sbírána do nových skleněných zkumavek. Následně byly vzorky odpařeny na rotační vakuové odparce.

3.2.3. Analýza vzorků pomocí UHPLC-MS/MS

Před samotnou analýzou byly vzorky rozpuštěny v 50 µl MeOH, vloženy na 3 minuty do ultrazvukové lázně a promíchány. Následně byly vzorky přeneseny do plastových zkumavek s mikrofiltrem, uzavřeny a vloženy do centrifugy na 3 minuty a 8000 rpm. Přefiltrovaný obsah byl přenesen do insertu vialek s kónickým dnem, vialky byly uzavřeny a uskladněny při -20 °C.

UHPLC-MS/MS analýza byla provedena za asistence Ing. Petry Amakorové podle zavedených a publikovaných metod (BRs-Oklešťková et al., 2017, steroidní hormony-Simerský et al., 2009). Pro analýzu BRs byly z každého vzorku injektovány 2 µl na UHPLC

chromatografickou kolonu s reverzní fází (Acquity CSH C18 Phenyl-Hexyl, 2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm, Waters). Kolona byla temperována na 40 °C. Mobilní fází byl acetonitril (A) okyselený 10 mM kyselinou mravenčí (B). BRs byly izokraticky eluovány během 1,5 minuty. Pro následnou kvantifikaci byl použit kvadrupólový hmotnostní spektrometr Xevo TQ MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) s ionizací elektrosprejem a kolizní celou Scan Wave. Brassinosteroidy byly analyzovány v pozitivním iontovém módu (ESI+). Hmotnostní spektrometr byl nastaven takto: napětí na kapiláře 3,0 kV, napětí na kóně 20 V, teplota zdroje 120 °C, teplota desolvatačního plynu 550 °C a průtok desolvatačního plynu 600 l h⁻¹ (Oklešťková et al., 2017).

Podmínky pro analýzu steroidních hormonů byly tyto: 2 µl vzorku byly nastříknuty na UHPLC chromatografickou kolonu s reverzní fází BEH C18, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm, (Waters). Kolona byla temperována na 40 °C. Mobilní fází byl MeOH (A) okyselený 10 mM kyselinou mravenčí (B) v počátečním poměru 40 (A):60 (B). Délka jedné analýzy byla 19 minut. Chromatografická separace probíhala při průtokové rychlosti 0,3 ml · min⁻¹. Analyty byly detekovány prostřednictvím tandemového hmotnostního spektrometru Xevo TQ MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) s ESI ionizací v pozitivním módu. Součástí hmotnostního spektrometru byl trojitý kvadrupól. Analýza probíhala za následující podmínek: teplota zdroje 150 °C, napětí na kapiláře 2,5 kV, desolvatační teplota 350 °C a průtok desolvatačního plynu 500 l hod⁻¹. V rámci této analýzy byl využit režim selektivního záznamu více reakcí (MRM) (Simerský et al., 2009).

Vyhodnocení jednotlivých analytů proběhlo pomocí programů MassLynxTM a TargetLynxTM. Kvantifikace steroidních látek v analyzovaných vzorcích byla provedena s využitím metody izotopického ředění.

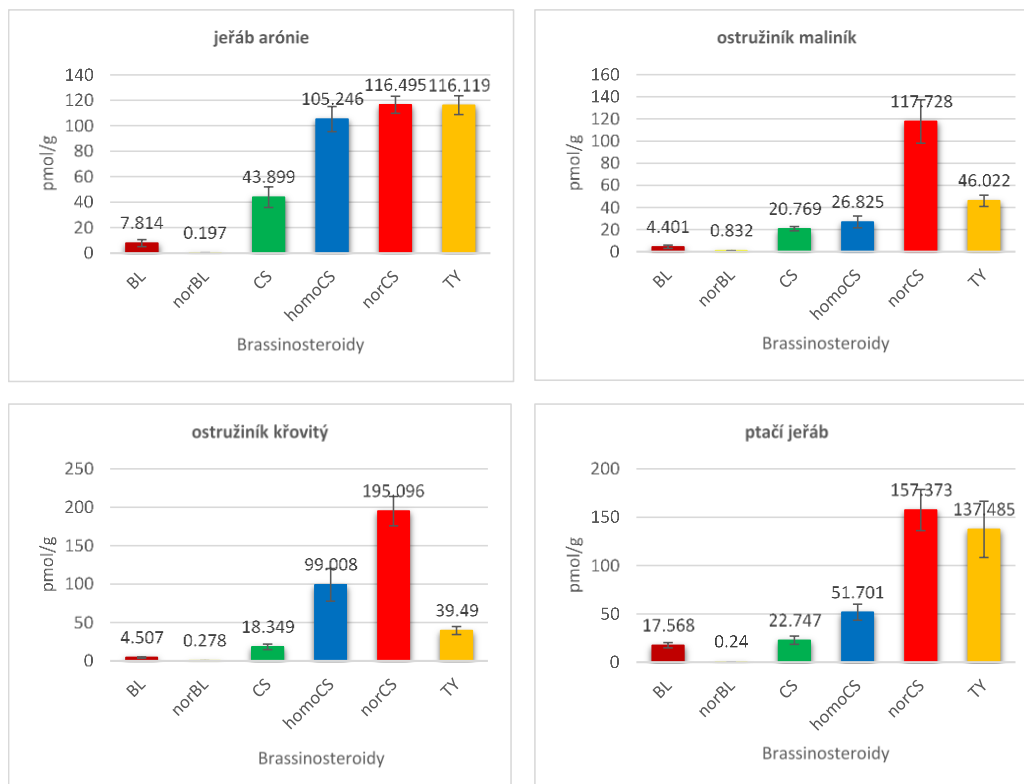
4. Výsledky

4.1. Stanovení hladin brassinosteroidů v rostlinném materiálu

V této diplomové práci byly pomocí LC-MS analýzy stanovovány tyto brassinosteroidy: brassinolid, 28-homobrassinolid, 28-norbrassinolid, 24-epibrassinolid, castasteron, 28-homocastasteron, 28-norcastasteron, 24-epicastasteron, teasteron, typhasterol. V listových pupenech rostlin se nakonec podařilo stanovit brassinolid, 28-norbrassinolid, castasteron, 28-homocastasteron, 28-norcastasteron a typhasterol.

U čeledi růžovité se vyskytoval nejvíce 28-norcastasteron v koncentraci od 116,495 do 195,096 pmol/g suché hmoty. Typhasterolu bylo nejvíce stanoveno u jeřábu arónie 116,119 pmol/g a ptačího jeřábu 137,485 pmol/g. 28-homocastasteronu bylo nejvíce stanoveno u jeřábu arónie 105,246 pmol/g a ostružiníku křovitého 99,008 pmol/g. Brassinolid byl stanoven v rozmezí 4,401 až 17,568 pmol/g. 28-norbrassinolid se vyskytoval u čeledi růžovité nejméně a to v rozmezí 0,197 až 0,832 pmol/g (Obr. 5).

Růžovité



Obr. 5: Obsah studovaných brassinosteroidů ve vzorcích pupenů z čeledi růžovité (BL – brassinolid, norBL – 28-norbrassinolid, CS – castasteron, homoCS – 28-homocastasteron, norCS – 28-norcastasteron, TY – typhasterol); chybové úsečky odpovídají SD, n=5.

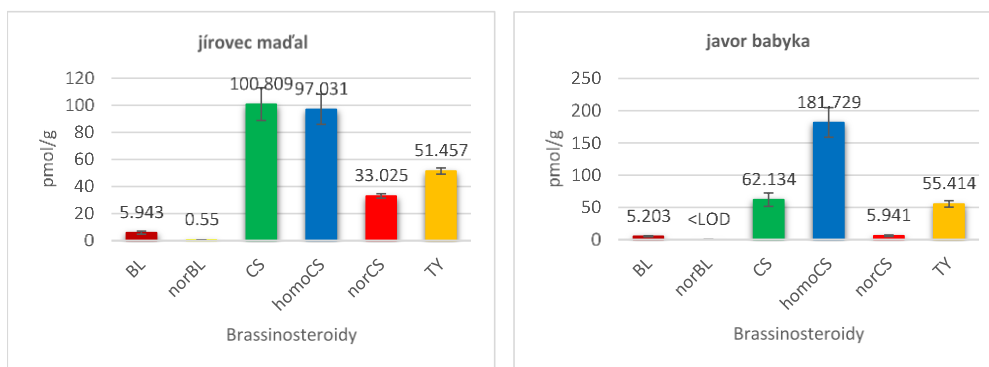
U čeledi mýdelníkovité bylo stanoveno nejvíce 28-homocastasteronu a to u javoru babyka 181,729 pmol/g suché hmoty. Castasteron se vyskytoval nejvíce u jírovce maďalu 100,809

pmol/g. U javoru babyka byla stanovena koncentrace typhasterolu 55,414 pmol/g a v podobném množství i u jírovce maďalu 51,457 pmol/g. 28-norcastasteron bylo stanoveno větší množství u jírovce maďalu 33,025 pmol/g. Brassinolid byl stanoven v podobné koncentraci u jírovce maďalu 5,943 pmol/g a u javoru babyka 5,203 pmol/g. 28-norbrassinolid byl stanoven ve velmi malém množství, u javoru babyka byla jeho koncentrace pod limitem detekce (Obr. 6).

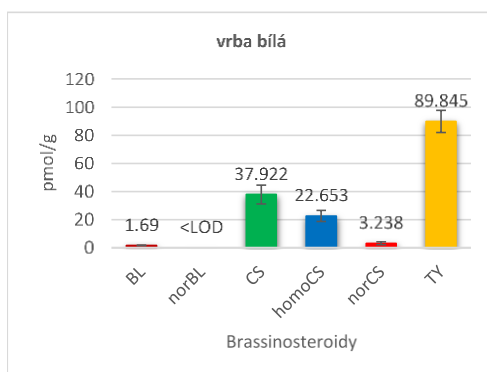
U lísky obecné bylo stanoveno nejvíce typhasterolu 18,671 pmol/g a castasteronu 17,407 pmol/g suché hmoty. 28-homocastasteron byl stanoven v koncentraci 11,45 pmol/g a 28-norcastasteron v koncentraci 3,998 pmol/g. Nejméně bylo naměřeno brassinolinu 1,04 pmol/g a 28-norbrassinolidu (Obr. 6).

U vrby bílé bylo stanoveno nejvíce typhasterolu 89,845 pmol/g, potom castasteronu 37,922 pmol/g, 28-homocastasteron byl v koncentraci 22,653 pmol/g a 28-norcastasteronu 3,238 pmol/g. Nejméně bylo stanoveno brassinolidu 1,69 pmol/g a 28-norbrassinolid byl změřen pod detekovatelnou hranici (Obr. 6).

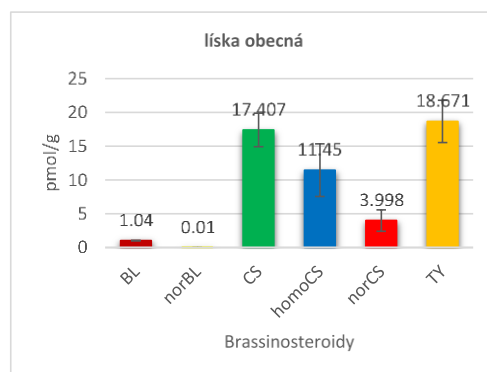
Mýdelníkovité



Vrbovité



Břízovité



Obr. 6: Obsah studovaných brassinosteroidů ve vzorcích pupenů z čeledi břízovité, mýdelníkovité a vrbovité (BL – brassinolid, norBL – 28-norbrassinolid, CS – castasteron, homoCS – 28-homocastasteron, norCS – 28-norcastasteron, TY – typhasterol); chybové úsečky odpovídají SD, n=5.

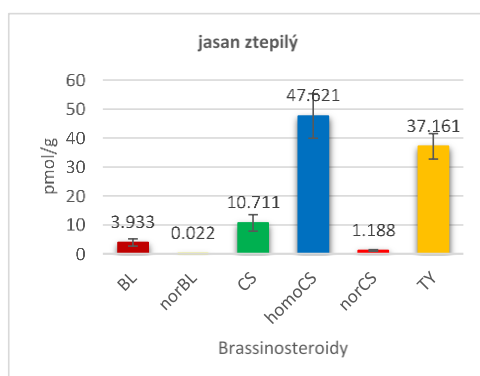
U jasanu ztepilého bylo stanoveno nejvíce 28-homocasteronu 47,621 pmol/g a typhasterolu 37,161 pmol/g. V nejmenší koncentraci byl stanoven 28-norbrassinolid 0,022 pmol/g a 28-norcastasteron 1,188 pmol/g (Obr.7).

U lípy srdčité bylo stanoveno nejvíce typhasterolu 65,626 pmol/g, ostatní brassinosteroidy byly stanoveny v menším množství, nejméně bylo stanoveno 28-norbrassinolidu 0,068 pmol/g (Obr. 7).

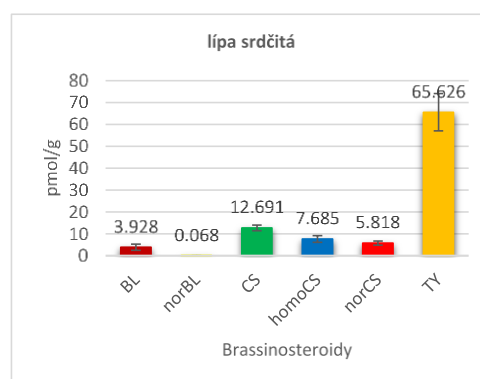
U černého rybízu bylo stanoveno nejvíce 28-homocasteronu 345,736 pmol/g suché hmoty. V podobné koncentraci byl stanoven castasteron 85,182 pmol/g a typhasterol 84,212 pmol/g. Taktéž 28-norcastasteron 25,375 pmol/g a brassinolid 23,367 pmol/g. Nejméně bylo stanoveno 28-norbrassinolidu 0,11 pmol/g (Obr. 7).

U jinanu dvouláložného bylo nejvíce stanoveno 28-homocasteronu 75,878 pmol/g a typhasterolu 63,693 pmol/g. Nejméně brassinolidu 5,229 pmol/g a 28-norbrassinolidu 0,12 pmol/g (Obr. 7).

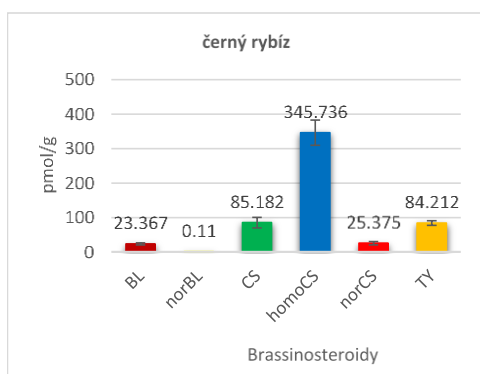
Olivovníkovité



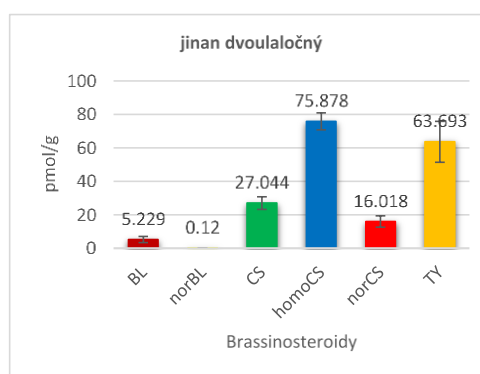
Slézovité



Meruzalkovité



Jinanovité



Obr.7: Obsah studovaných brassinosteroidů ve vzorcích z čeledi olivovníkovité, slézovité, meruzalkovité a jinanovité (BL – brassinolid, norBL – 28-norbrassinolid, CS – castasteron, homoCS – 28-homocasteron, norCS – 28-norcastasteron, TY – typhasterol); chybové úsečky odpovídají SD, n=5.

Celkově v detekci brassinosteroidů bylo stanoveno nejvíce 28-homocastasteronu u černého rybízu (Obr. 7) a nejméně 28-norbrassinolidu, který byl u javoru babyka a vrby bílé pod detekovatelnou hranicí (Obr. 6). U většiny výsledků je patrné, že v rostlinných pupenech převažují BRs s 6-oxo- strukturou B kruhu nad těmi s 7-oxalaktonovým uspořádáním.

Ve vzorcích olše lepkavé, topolu černého a břízy bělokoré se z důvodu silného matričního efektu nepodařilo BRs správně kvantifikovat. Pro případné publikování výsledků bude potřeba pokus opakovat a upravit navážky rostlinného materiálu, případně modifikovat postup čištění.

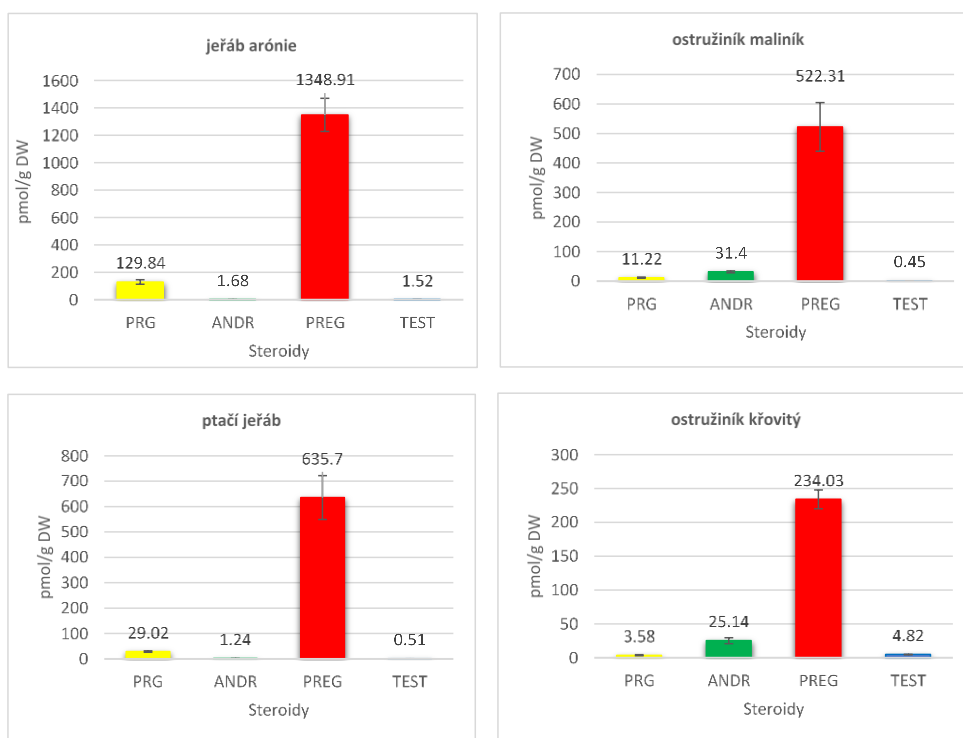
4.2. Stanovení hladin savčích steroidních hormonů v rostlinném materiálu

V této diplomové práci byly pomocí MS analýzy také studovány tyto steroidní hormony: progesteron, pregnenolon, pregnandion, testosteron, androstendion, DHEA, estron, 17 β -estradiol. V listových pupenech rostlin se nakonec podařilo kvantifikovat pouze progesteron, androstenedion, pregnenolon a testosteron.

U všech vzorků bez ohledu na čeleď se vyskytovalo nejvíce pregnenolonu, kromě černého rybízu. Nejvíce pregnenolonu bylo naměřeno u topolu černého 5628,69 pmol/g (Obr. 10) a břízy bělokoré 4644,96 pmol/g (Obr. 9). Naopak nejméně pregnenolonu bylo stanoveno u lípy srdčité 5,56 pmol/g (Obr. 11). U černého rybízu bylo stanoveno nejvíce progesteronu 737,05 pmol/g (Obr. 11). Také u jeřábu arónie a topolu černého bylo stanoveno větší množství progesteronu, u jeřábu arónie 129,84 pmol/g (Obr. 8) a u topolu černého 335,29 pmol/g (Obr. 10). Testosteron a androstenedion se vyskytoval v rostlinách ve velmi malých koncentracích. Nejvíce androstenedionu bylo stanoveno u ostružiníku maliníku 31,4 pmol/g (Obr. 8) a nejvíce testosteronu bylo stanoveno u lísky obecné 13,89 pmol/g (Obr. 9).

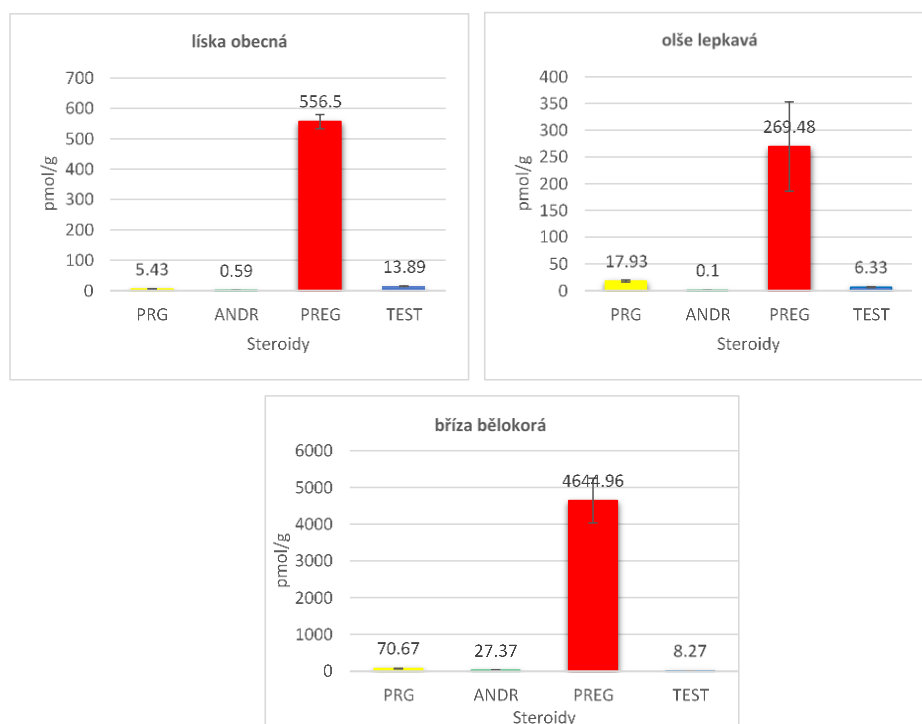
Převahu pregnenolonu lze vysvětlit tím, že tato látka je prekurzorem pro biosyntézu všech ostatních steroidních hormonů.

Růžovité



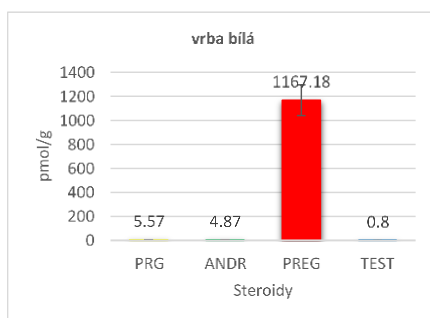
Obr. 8: Obsah savčích steroidních hormonů v pupenech rostlin z čeledi růžovité (PRG – progesteron, ANDR – androstenedion, PREG – pregnenolon, TEST – testosteron; chybové úsečky odpovídají SD, n=5).

Břizovité

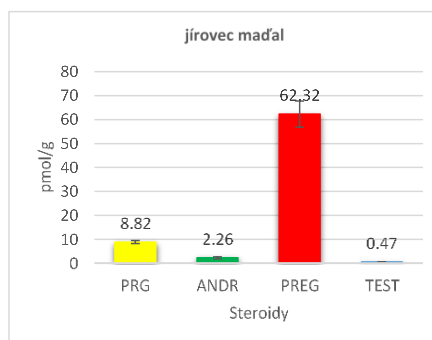
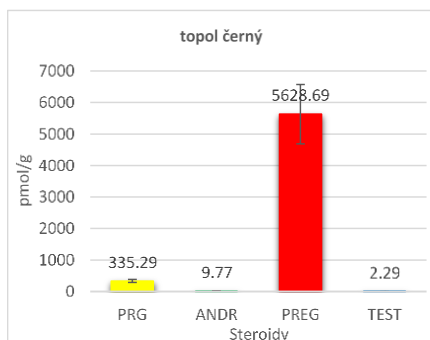
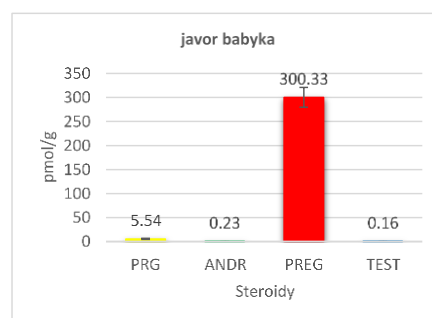


Obr. 9: Obsah savčích steroidních hormonů v pupenech rostlin z čeledi břizovité (PRG – progesteron, ANDR – androstenedion, PREG – pregnenolon, TEST – testosteron); chybové úsečky odpovídají SD, n=5).

Vrbovité

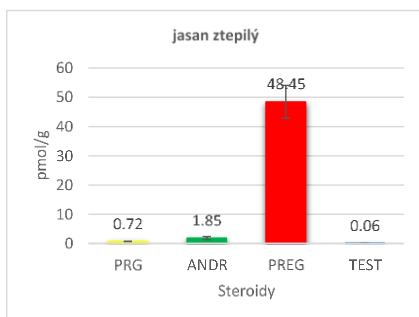


Mýdelníkovité

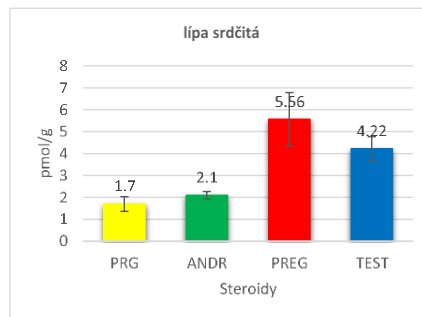


Obr. 10: Obsah savčích steroidních hormonů v pupenech rostlin z čeledi vrbovité a mýdelníkovité (PRG – progesteron, ANDR – androstenedion, PREG – pregnenolon, TEST – testosteron); chybové úsečky odpovídají SD, n=5.

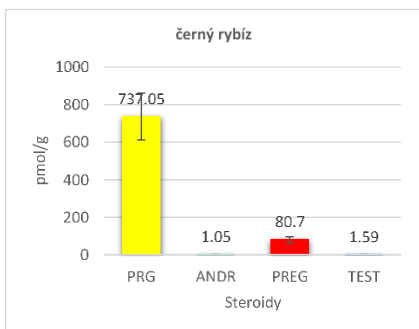
Olivovníkovité



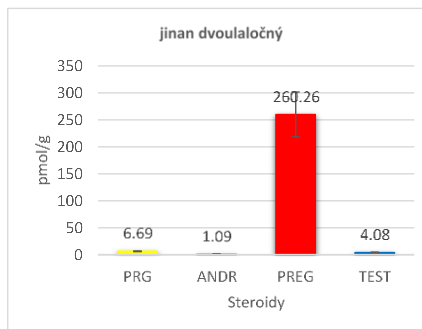
Slézovité



Meruzalkovité



Jinanovité



Obr. 11: Obsah savčích steroidních hormonů v pupenech rostlin z čeledi olivovníkovité, slézovité, meruzalkovité a jinanovité (PRG – progesteron, ANDR – androstenedion, PREG – pregnenolon, TEST – testosteron); chybové úsečky odpovídají SD, n=5.

5. Diskuze

Cílem této práce bylo stanovit množství brassinosteroidů a savčích steroidních látek pomocí UHPLC-MS/MS metody v listových pupenech rostlin, které jsou využívány v gemmoterapii. Pokud je známo, obsah steroidních látek v tomto typu rostlinného materiálu dosud nebyl systematicky studován a je možné, že právě koncentrace steroidních látek ovlivňují léčebné účinky těchto rostlin.

Přítomnost steroidních hormonů v rostlinách byla popsána již v 60. letech 20. století Gawienowskim a Gibbsem. Přítomnost progesteronu později zaznamenali i Simons a Grinwich, kteří zkoumali steroidní hormony v řadě rostlinných druhů. Všimli si, že hladiny progesteronu se mění za určitých fyziologických procesů. Například koncentrace progesteronu v listech *Prunus virginiana* L. (čeleď růžovité) byla stanovena na 13 ng g⁻¹ suché hmotnosti, v poupatech se koncentrace zvýšila na 58 ng (přibližně 184 pmol/g) a v květech opět klesla na 7 ng (Janeczko, 2012). Tyto hodnoty lze srovnat s námi naměřenými hodnotami ve stejné čeledi (viz obr. 8). Lino et al. (2007) identifikovali a kvantifikovali progesteron u sedmi dvouděložných a dvou jednoděložných rostlin. Poprvé zaznamenali přítomnost progesteronu u *Arabidopsis thaliana* L. Steroid byl nalezen ve výhonech a květenstvích v koncentracích 160 a 400 ng/kg⁻¹ čerstvé hmotnosti. Simerský et al. (2009) díky přesnější metodě detekovali přítomnost progesteronu například u *Nicotiana tabaccum* L. (55,46 pmol/g⁻¹) a *Inula helenium* L. (2,10 pmol/g⁻¹) (Lino et al, 2007). Naopak androgeny tzn. testosteron a androstendion se v rostlinách vyskytují v menších koncentracích. Simerský et al. (2009) detekovali androstendion v *Nicotiana Tabaccum* L. v koncentraci 7,7 pmol/g, také zjistili, že extrakty z *Inula helenium* L. obsahují 11 pmol/g androstendionu. V této práci byl progesteron detekován v koncentraci 737,05 pmol/g u černého rybízu *Ribes nigrum*. Dále bylo velké množství progesteronu stanoveno u jeřábu aronie *Aronia melanocarpa* 129,84 pmol/g a u topolu černého *Populus nigra* 335,29 pmol/g. U většiny vzorků se vyskytovalo nejvíce pregnenolonu. U topolu černého *Populus nigra* byla naměřena koncentrace pregnenolonu 5628,69 pmol/g a u břízy bělokoré *Betula pendula* 4644,96 pmol/g. Vysoké množství pregnenolonu si můžeme vysvětlit tím, že se z pregnenolonu a cholesterolu syntetizují všechny ostatní steroidní hormony (Obr. 4). Naopak nízké množství testosteronu a androstenedionu, které bylo naměřeno u všech vzorků, můžeme zdůvodnit tím, že jsou tyto steroidní hormony syntetizovány až jako další produkty v syntéze steroidních hormonů (Obr. 4). Nejvíce androstendionu bylo naměřeno u ostružiníku maliníku *Rubus ideaus* 31,4 pmol/g a nejvíce testosteronu bylo stanoveno u lísky obecné *Corilus avellana* 13,89 pmol/g.

Brassinosteroidy jsou široce rozšířeny v rostlinách, jejich přítomnost byla potvrzena u řas, mechů a cévnatých rostlin. V této práci jsou výsledky brassinosteroidů velice různorodé. U většiny výsledků bylo zřejmé, že převažují struktury 6-oxo- (deriváty castasteronu) nad 7-

oxolaktonovou (deriváty brassinolidu). U čeledi růžovité se vyskytovalo nejvíce 28-norcastasteronu a to v koncentraci od 116,495 do 195,096 pmol/g suché hmoty. Typhasterol se vyskytoval nejvíce u jeřábu aronie *Aronia melanocarpa* 116,119 pmol/g a ptačího jeřábu *Sorbus aucuparia* 137,485 pmol/g. U čeledi mýdelníkovité bylo stanoveno nejvíce 28-homocastasteronu u javoru babyka *Acer campestre* 181,729 pmol/g. Nejvíce Castasteronu bylo naměřeno u jírovce maďalu *Sorbus aucuparia* 100,809 pmol/g. Ikekawa et al (1984) uvádí množství castasteronu v *Brassica campestris* 1600 µg/kg. Nejmenší koncentrace byla naměřena u 28-norbrassinolidu, u javoru babyka *Acer campestre* dokonce pod hranicí detekce. Pod hranicí detekce byl 28-norbrassinolid změřen i u vrby bílé *Salix alba*. U černého rybízu *Ribes nigrum* bylo stanoveno největší množství, ze všech naměřených výsledků, 28-homocastasteronu 345,736 pmol/g. Ikekawa et al (1984) uvádí koncentraci 28-homocastasteronu u *Brassica campestris* 130 µg/kg. U *Hydrodictyon reticulatum* byla naměřena koncentrace 28-homocastasteronu pouhých 4 µg/kg (Yokota et al, 1987). Ikeda et al (1983) uvádí množství brassinolidu u *Castanea crenata* 4–12 µg/kg, u *Fagopyrum esculentum* byl brassinolid stanoven 5 µg/kg (Takatsuto et al, 1990). V mých výsledcích se brassinolid nacházel v koncentracích 1–23 pmol/g suché hmoty. Malé koncentrace 28-norbrassinolidu a brassinolidu a naopak vysoké koncentrace 28-norcastasteronu, 28-homocastasteronu a castasteronu si můžeme vysvětlit tím, že v biosyntéze brassinosteroidů je castasteron u většiny rostlin koncová sloučenina BRs, jen u málo rostlin pokračuje biosyntéza na koncový produkt brassinolid (viz obr. 2) (Hayat & Ahmad, 2011).

Na základě získaných výsledků lze usoudit, že steroidní látky se v mladých rostoucích rostlinných tkáních vyskytují v poměrně vysokých koncentracích v závislosti na jednotlivých čeledích.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce byly studovány savčí steroidní hormony a brassinosteroidy v listových pupenech rostlin. Bylo zjištěno, že se v rostlinných pupenech vyskytují savčí steroidní hormony i brassinosteroidy v poměrně velkém množství.

Nejvyšší koncentrace byla detekována u progesteronu v koncentraci 737,05 pmol/g u černého rybízu *Ribes nigrum*. Černý rybíz v kombinaci ostružiníku maliníku pomáhá léčit vaječnickové cysty, ostružiník maliních působí také proti menstruačním poruchám a tlumí poševní záněty. Dále bylo velké množství progesteronu stanoveno u jeřábu arónie *Aronia melanocarpa* 129,84 pmol/g, ten pomáhá snižovat krevní tlak, zlepšuje pevnost a pružnost cév a harmonizuje činnost štítné žlázy. Vysoké množství progesteronu bylo také stanoveno i u topolu černého *Populus nigra* 335,29 pmol/g. U topolu černého *Populus nigra* bylo naměřena nejvyšší koncentrace pregnenolonu 5628,69 pmol/g, topol černý má antioxidační, protizánětlivé a antibakteriální účinky, a také má účinek na produkci melaninu. Koncentrace pregnenolonu u břízy bělokoré *Betula pendula* je 4644,96 pmol/g, bříza bělokorá stimuluje jaterní funkce, činnost slinivky a užívá se také pro svou čistící schopnost.

U brassinosteroidů bylo stanoveno největší množství 28-homocastasteronu 345,736 pmol/g u černého rybízu *Ribes nigrum*, jako u savčích steroidních hormonů. Černý rybíz se také označuje jako antialergikum vhodný při senné rýmě nebo astmatu. V kombinaci s šípkovou růží a kalinou slouží také při léčbě prostaty starších mužů. Dále lze použít při snížené funkci nadledvinek nebo při těžkých formách zánětu. Nejvíce Castasteronu bylo naměřeno u jírovce maďala *Sorbus aucuparia* 100,809 pmol/g, jírovec maďal má blahodárné působení na cévy a kapiláry a celkově na krevní oběh v končetinách. Nejvyšší množství 28-norcastasteronu bylo stanoveno u ostružiny křovité *Rubus fruticosus* 195,096 pmol/g, ostružiník působí antiskleroticky a antidegenerativně a pomáhá léčit dnu a revmatismus.

Cílem této práce bylo napsat literární rešerši, která popisuje léčebnou metodu gemmoterapie a problematiku výskytu steroidních látek v rostlinách. V experimentální části byla provedena kvantifikace hormonů z rostlinného materiálu pomocí UHPLC-MS/MS metody. Všechny cíle této práce byly splněny.

7. Seznam literatury

- Ahammed, G. J., Li, X., Liu, A. & Chen, S., 2020: Brassinosteroids in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*. 39, 1451–1464.
- Andrienne, P., 2007: *Velká kniha gemmoterapie*. 1. vydání. Olomouc: FONTÁNA, str. 262. ISBN 978-80-7336-382-6.
- Azman, N. A. M., Skowrya, M., Muhammad, K., Gallego, M. G. & Almajano, M.P., 2016: Evaluation of the antioxidant activity of *Betula pendula* leaves extract and its effects on model foods. *Pharmaceutical Biology*. 55, 912-919.
- Bajguz, A., Chmur, M. & Gruszka, D., 2020: Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections. *Plant Science*. 11, 1034.
- Başer, K.H.C. & Dermici, B., 2007: Studies on *Betula* essential oils. *Arkivoc*. 7, 335–348.
- Behmer, S. T. & Nes, W. D., 2003: Insect sterol nutrition and physiology: A global overview. *Adv. Insect Physiology*. 31, 1–72.
- Cittan, M., Altuntas, E. & Celik, A., 2018: Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method. *Industrial Crops and Products*. 122, 15.
- Clouse S. D. Langford, M., McMorris, T. C., 1996: A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology*. 111, 671-678.
- Clouse, S. D., 2011: Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. *Plant Cell*. 23, 1219–1230.
- Darme, P., Spalenka, J., Hubert, J., Escotte-Binet, S., Debelle, L., Villena, I., Sayagh, Ch., Aubert, D. et al, 2021: Investigation of antiparasitic activity of ten European tree bark extracts on *Toxoplasma gondii* and bioguided identification of triterpenes in *Alnus glutinosa* barks. *Antimicrobial agents and gemotherapy*. 66, 1.
- Donno D., Beccaro, G. L., Cerutti, M. G., Bounous, M. & Bonous, G., 2015: Bud Extracts as New Phytochemical Source for Herbal Preparations – Quality Control and Standardization by Analytical Fingerprint. *Phytochemicals: Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. 187-218.
- Ercoli A., 2002: *Clinica medica in fitogemmoterapia e omeopatia*. Tecniche Nuove, Milán. 275.

- Espenshade, P. J. & Hughes, A. L., 2007: Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 41, 401–427.
- Gallego, A., Malik, S., Yousefzadi, M., Makhzoum, A., Tremouillaux-Guiller, J. & Bonfill, M., 2017: Taxol from *Corylus avellana*: paving the way for a new source of this anti-cancer drug. *Plant Cell*. 129, 1–16.
- Giacomo, V., Ferrante, C., Ronci, M., Cataldi, A., Valerio, V., Rapino, M., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leone, S., Knežević, S. V., Kundl, M., Brunetti, L., Menghini, L., Orlando, G., 2019: Multiple pharmacological and toxicological investigations on *Tanacetum parthenium* and *Salix alba* extracts: Focus on potential application as anti-migraine agents. *Food and Chemical Toxicology*. 133, 110783.
- Hartmann, M., 1998: Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Science*. 3, 170–175.
- Hayat, S. & Ahmad, A., 2011: *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*. Springer Science+Business Media. Department of Botany. ISBN: 987-94-007-0188-5.
- Hubele L., 2016: Gemmotherapy for everyone – an introduction to acute care. *Emryss*. 128.
- Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K & Ellinger, I., 2018: Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. *Experimental Pharmacology and Drug Discovery*. 9, 1027.
- Chmur, M. & Bajguz, A., 2021: Brassinolide Enhances the Level of Brassinosteroids, Protein, Pigments, and Monosaccharides in *Wolffia arrhiza* Treated with Brassinazole. *Plants*. 10(7), 1311.
- Chrischta, G. & Luis, H., 2021: *Gemmoterapie, základní kniha*. Olomouc, Fontána. ISBN: 978-80-7651-068-5.
- Ikedo, M., Takatsuko, S., Sassa, T., Ikekawa, N. & Nukina, M., 1983: Identification of brassinolide and its analogues in chestnut gall tissue. *Agricultural and Biological Chemistry*. 36, 655-657.
- Ikekawa, N., Takatsuto, S., Kitsuwa, T., Saito, H., Morishita, T. & Abe, H., 1984: Analysis of natural brassinosteroids by gas chromatography and gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 290, 289-302.
- Ionescu, M. I., 2017: *Are Herbal Products an Alternative to Antibiotics? Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*, IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen. 72110.

- Janeczko, A. & Skoczowski, A., 2005: Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 43, 71–79.
- Janeczko, A., 2012: The presence and activity of progesterone in the plant kingdom. *Steroids*. 77, 169-173.
- Janeczko, A., 2021: Estrogens and Androgens in Plants: The Last 20 Years of Studies. *Plants*. 10(12), 2783.
- Kis, B., Avram, S., Pavel, I. Z., Lombrea, A., Buda, V., Dehelean, C. A., Soica, C., Yeter, M. B., Bojin, F., Folescu, R. & Danciu, C., 2020: Recent Advances Regarding the Phytochemical and Therapeutic Uses of *Populus nigra* L. *Buds. Plants*. 9(11), 1464.
- Lino, M., Nomura, T., Tamaki, Y., Yamada, Y., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Mori, M., Asami, T., Nakano, T. & Yokota, T., 2007: Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth. *Phytochemistry*. 68, 1664-1673.
- Liu, H, Ye, M., Guo, H., 2020: An Updated Review of Randomized Clinical Trials Testing the Improvement of Cognitive Function of *Ginkgo biloba* Extract in Healthy People and Alzheimer's Patients. *Frontiers in Pharmacol*. 10, 1688.
- Maghsoudi, H. & Haj-allahyari S., 2018: Down regulation of COX-2, IL-1 β , TNF- α in cynoviocyte by essential oil of *Fraxinus excelsior*. *Medicine*. 9, 3.
- Maistro, E. L., Terrazzas, P. M., Perazzo, F. F., Gaivao, I., Sawaya, A. Ch. H. F. & Rosa, P. C. P., 2020: *Salix alba* (white willow) medicinal plant presents genotoxic effects in human cultured leukocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1223-1234.
- Mushkina V., 2021: Effect of wound healing in gels containing tinctures of *Alnus glutinosa* (L) leaves. *Clinical Phytoscience*. 7, 62.
- Naděje, Mgr. J. Podhorná. [Online] [Citace: 1. 11. 2021] <https://nadeje-byliny.eu/>.
- Nassima, B., Nassima, B. & Riadh, K., 2019: Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55.
- Nolan, T. M., Vukašinovic, N., Liu, D., Russinova, E. & Yin, Y., 2020: Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses. *The Plant Cell*. 32, 2, 295–318.
- Okleštková, J., Tarkowská, D., Eyer, L., Elbert, T., Marek, A., Smržová, Z., Novák, O., Fránek, M., Zhabinskii, V. N. & Strnad, M., 2017: Immunoaffinity chromatography combined with

tandem mass spectrometry: A new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroid plant hormones. *Talanta*. 170, 1, 432-440.

Peres, G. L., Soares, J. S., Tavares, R. G., Righetto, G., Zullo, M. A. T., Mandava, N. B. & Menossi, M., 2019: Brassinosteroids, the Sixth Class of Phytohormones: A Molecular View from the Discovery to Hormonal Interactions in Plant Development and Stress Adaptation. *International Journal of Molelecular Sciences*. 20(2), 331.

Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J. & Lampi, A. M., 2000: Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of Science*. 80, 939–966.

Podhorná, J., 2015: *Byliny léčí*. 4. přepracované vydání. Prostějov: WALKER, str. 190. ISBN 978-80-905444-6-8.

Riis, P. T., Ring, H. Ch., Themstrup, L. & Jemec, G. B., 2016: The role of androgens and estrogens in hidradenitis suppurativa: A systematic review. *Acta Dermatovenerologica Croatia*. 24, 239–249.

Rozhon, W. & Akter, S., 2019: Inhibitors of Brassinosteroid Biosynthesis and Signal Transduction. *Molecules*. 24(23), 4372.

Russo, J. & Russo, I. H., 2006: The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 102, 89–96.

Sarv, V., Venskutonis, P. R., Ratsep, R., Aluvee, A., Kazernavičiute, R. & Bhat, R., 2021: Antioxidants Characterization of the Fruit, Juice, and Pomace of Sweet Rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.) Cultivated in Estonia. Academic Editor: Catalina Alarcòn de-la-Lastra. *Antioxidants*. 10(11), 1779.

Şen Utsukarçi, B., Bal, Y. S., Gurdal, B., Bardakci, H., Yilmaz, F. N. & Dosler, S., 2020: Pharmacognostical Studies on *Acer campestre*. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2, 126-138.

Siddiqui, H., Hayat, S. & Bajguz, A., 2018: Regulation of photosynthesis by brassinosteroids in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 40, 59.

Sidor, A., Drożdżynska, A. & Grazma-Michalowska, A., 2019: Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and its products as potential health-promoting factors-An overview. *Trends in Food Science & Technology*. 89, 45-60.

- Simerský, R., Novák, O., Morris, D. A., Pouzar, V. & Strnad, M., 2009: Identification and Quantification of Several Mammalian Steroid Hormones in Plants by UPLC-MS/MS. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28, 125–136.
- Simons, R. G. & Grinwich, D. L., 1989: Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants. *Canadian Journal of Botany*. 67, 288–296.
- Singh, S. K., 2019: Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*. 16, 666–674.
- Szymanowska, U., Baraniak, B. & Bogucka-Kocka, A., 2018: Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Postulated Cytotoxic Activity of Phenolic and Anthocyanin-Rich Fractions from Polana Raspberry (*Rubus idaeus L.*) Fruit and Juice-In Vitro Study. *Molecules*. 23(7), 1812.
- Šveňková, S., 2016: *Medicína 3. tisíciletí*. [Online] [Citace: 25. 10. 2021] <https://spresspublishing.cz/blog/?p=177>.
- Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K. & Ishibashi, M., 1990: Identification of brassinolide and castasterone in buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) pollen. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54, 757-762.
- Tarkowská, D. & Strnad, M., 2018: Isoprenoid-derived plant signaling molecules: Biosynthesis and biological importance. *Planta*. 247, 1051–1066.
- Tarkowská, D., 2019: Plants are Capable of Synthesizing Animal Steroid Hormones. *Molecules*. 24(14), 2585.
- Tarkowská, D., Novák, O., Okleštková, J. & Strnad, M., 2016: The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC–ESI–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 408, 6799–6812.
- Tetau, M., 2013: *Nové léčebné postupy v gemmoterapii*. 1. přepracované vydání. Prostějov: WALKER, str. 93. ISBN 978-80-905444-1-3.
- Veljkovic, B., Djordjevic, N., Dolicanin, Z., Licina, B., Topuzovic, M., Stankovic, M., Zlatic, N., Dajic-Stevanovic, Z., 2019: Antioxidant and Anticancer Properties of Leaf and Fruit Extracts of the Wild Raspberry (*Rubus idaeus L.*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 47(2), 359-367.
- Wei, Z. & Li, J., 2020: Regulation of Brassinosteroid Homeostasis in Higher Plants. *Plant Physiology*. 29.

Wu, G., Wang, X., Li, X., Kamiya, Y., Otegui, M. S. & Chory, J., 2011: Methylation of a Phosphatase Specifies Dephosphorylation and Degradation of Activated Brassinosteroid Receptors. *Science Signaling*. 4, 1–25.

Yousefbeyk F., Ghasemi, S., Evazalipour, M., Dabirian, S., Schubert, C., Hekmatnia, S., Habibi, Y., Koohi, D. E. & Bohm, V., 2021: Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of leaves and roots of *Rubus hyrcanus Juz.* *European food research and technology*. 248, 141-152.

Yuhee, Ch. & Sungwa, Ch., 2013: The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 32, 6.

Zentrich, J. A., 2003: *Gemmoterapie: přírodní léčba pupeny*. Praha: Eminent, s. 141. ISBN 80-728-1136-3.

Zentrich, J., 2007: *Gemmoterapie přírodní léčba pupeny*. 3. vydání. Praha: Eminent, str. 171. ISBN: 978-80-7281-321-6.

Zhu, J. Y., Li, Y., Cao, D. M., Yang, H., Oh, E., Bi, Y., Zhu, S. & Wang, Z. Y., 2017: The F-box Protein KIB1 Mediates Brassinosteroid-Induced Inactivation and Degradation of GSK3-like Kinases in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*. 66, 648–657.

Zicong, L. & Yuehui, H., 2020: Roles of Brassinosteroids in Plant Reproduction. *Journal of Molecular Sciences*. 21(3), 872.

8. Přílohy

Příloha č. 1: Souhrnné výsledky kvantifikace živočišných steroidních hormonů v pupenech studovaných rostlin

Tabulka S 1: Kvantifikace steroidních hormonů systémem UHPLC-MS/MS

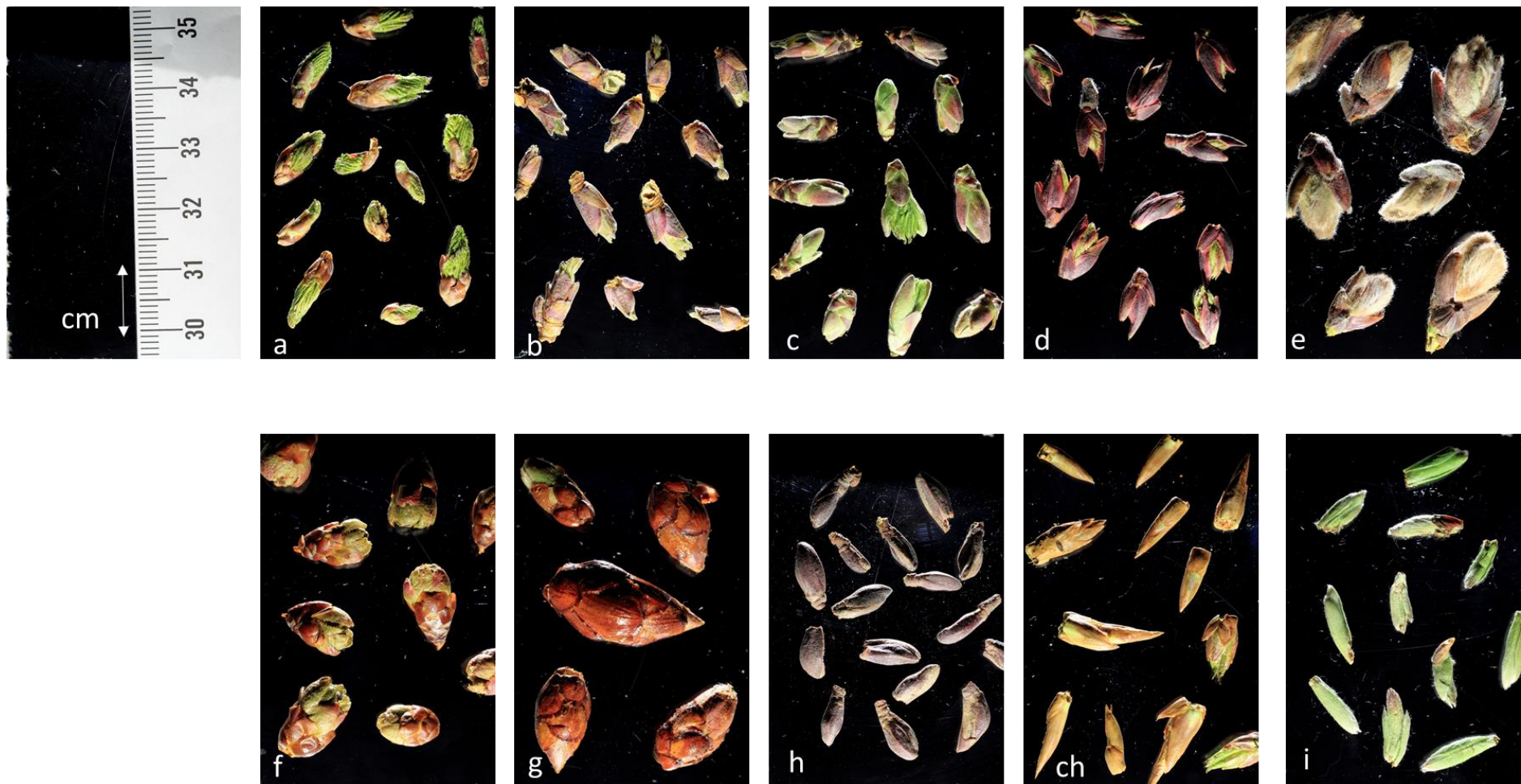
	mg (DW)	Progesteron		Androstenedion		Pregnenolon		Testosteron					
		pmol/g	průměr±SD	pmol/g	průměr±SD	pmol/g	průměr±SD	pmol/g	průměr±SD				
Jeřáb aronie	5.25	112.027	129.844 ±	16.5624	1.45543	1.67935 ±	0.29565	1163.58	1348.91 ±	120.795	1.86057	1.52011 ±	0.31645
Jeřáb aronie	6.5	141.635	RSD%	12.7557	2.24046	RSD%	17.605	1448.51	RSD%	8.95502	1.90185	RSD%	20.8175
Jeřáb aronie	5.37	130.22			1.71136			1474.2			1.44432		
Jeřáb aronie	5.02	111.466			1.45677			1251.01			1.30733		
Jeřáb aronie	5.1	153.869			1.53275			1407.27			1.08647		
Jasan ztepilý	5.56	0.67307	0.71899 ±	0.08601	1.39622	1.84546 ±	0.51543	50.8678	48.4546 ±	5.59426	0.02113	0.06364 ±	0.02229
Jasan ztepilý	5	0.67405	RSD%	11.9626	27.0363	RSD%	27.9298	229.459	RSD%	11.5454	0.06571	RSD%	35.0301
Jasan ztepilý	5.32	0.66114			1.5988			56.6998			0.08391		
Jasan ztepilý	5.38				1.66524			39.4375			0.07918		
Jasan ztepilý	6.68	0.8677			2.72156			47.5415			0.06826		
Ostružník křovitý	5.25		3.57976 ±	0.85423	24.271	25.1428 ±	4.49399	258.277	234.034 ±	13.9522	5.08876	4.82424 ±	0.18168
Ostružník křovitý	6.55	4.4266	RSD%	23.8628	27.0363	RSD%	17.8739	229.459	RSD%	5.96161	4.61405	RSD%	3.76599
Ostružník křovitý	5.14	2.5088			32.2451			239.317			4.85875		
Ostružník křovitý	5.6	4.40933			23.6486			217.991			4.62857		
Ostružník křovitý	5.83	2.97431			18.5127			225.126			4.93105		
Líska obecná	6.42	5.622	5.42638 ±	0.51279	0.79922	0.59583 ±	0.14644	587.002	556.505 ±	23	14.0111	13.8964 ±	0.44476
Líska obecná	5.4	5.51338	RSD%	9.45	0.45405	RSD%	24.5769	575.145	RSD%	4.13293	13.5996	RSD%	3.20056
Líska obecná	5.34	5.38282			0.45918			529.048			13.2757		
Líska obecná	5.08	4.51993			0.67087			559.424			13.9976		
Líska obecná	5.57	6.09376						531.907			14.598		
Olše lepkavá	6.3	14.7137	17.9355 ±	1.92732		0.10296 ±	0.02681	157.155	269.483 ±	83.4052	4.96857	6.33282 ±	1.10979
Olše lepkavá	5.67	17.0653	RSD%	10.7458		RSD%	26.0404	220.24	RSD%	30.9501	5.66667	RSD%	17.5244
Olše lepkavá	5.75	19.0712			0.10522			240.442			5.92		
Olše lepkavá	5.72	18.4714			0.13462			345.68			6.96364		
Olše lepkavá	6.19	20.3559			0.06906			383.897			8.14523		
Topol černý	6.09	256.118	335.296 ±	46.8276	9.31067	9.77441 ±	0.88962	4076.74	5628.69 ±	943.649	2.96962	2.29834 ±	0.76609
Topol černý	6.23	366.626	RSD%	13.966	9.46132	RSD%	9.10155	6043.72	RSD%	16.765	1.9496	RSD%	33.3322
Topol černý	5.47				8.9936			6377.83			2.1064		
Topol černý	5.33	345.515			11.5075			6608.45			1.15674		
Topol černý	5.78	372.927			9.59896			5036.72			3.30934		
Ptačí jeřáb	5.95	31.5463	29.0178 ±	2.53881	1.44353	1.24133 ±	0.22767	678.074	635.7 ±	86.5803	0.53697	0.51077 ±	0.04024
Ptačí jeřáb	5.83	28.4834	RSD%	8.74913	1.11475	RSD%	18.341	569.066	RSD%	13.6197	0.54924	RSD%	7.87917
Ptačí jeřáb	5.08	24.4083			0.93189			547.353			0.52815		
Ptačí jeřáb	5.96	30.9893			1.47517			784.469			0.50336		
Ptačí jeřáb	6.48	29.6619						599.539			0.43611		
Vrba bílá	6.46	6.06598	5.57453 ±	1.16931	4.10805	4.86989 ±	0.60768	1269.49	1167.18 ±	128.057	0.95697	0.80319 ±	0.15376
Vrba bílá	6.05	4.00566	RSD%	20.9759	4.44149	RSD%	12.4782	1339.34	RSD%	10.9714	0.92661	RSD%	19.1442
Vrba bílá	5.39	4.39225						1008.7			0.54174		
Vrba bílá	5.48	7.00661			5.51405			1180.07			0.72162		
Vrba bílá	5.32	6.40211			5.41598			1038.32			0.86898		
Javor babyka	6.15	3.65061	5.53935 ±	1.18712		0.22787 ±	0.02077	302.42	300.326 ±	20.5701	0.22	0.15787 ±	0.0406
Javor babyka	6.74	5.17022	RSD%	21.4307	0.22982	RSD%	9.11532	332.007	RSD%	6.84926	0.18516	RSD%	25.7159
Javor babyka	5.35	6.48229			0.2548			310.139			0.108		
Javor babyka	5.35	5.30547			0.23047			272.998			0.12455		
Javor babyka	5.56	7.08817			0.1964			284.064			0.15162		
Ostružník maliník	5.9	13.8682	11.2234 ±	1.95104	33.7931	31.3999 ±	2.9024	455.977	522.305 ±	82.2876	0.58331	0.45481 ±	0.11711
Ostružník maliník	5.27	8.67785	RSD%	17.3836	33.2662	RSD%	9.24335	506.775	RSD%	15.7547	0.62605	RSD%	25.7482
Ostružník maliník	6.42	12.5742			30.3134			466.29			0.42287		
Ostružník maliník	6.4	9.34035			26.16			500.211			0.57094		
Ostružník maliník	6.76	11.6565			33.4669			682.273			0.43491		
Černý rybíz	5.73		737.049 ±	124.821	0.85584	1.05024 ±	0.24837	100.057	80.7016 ±	15.9772	1.96614	1.58749 ±	0.35822
Černý rybíz	5.29	543.896	RSD%	16.9352		RSD%	23.6487	51.7352	RSD%	19.7978	1.3138	RSD%	22.5652
Černý rybíz	5.74	874.189			1.00261			86.6397			1.15455		
Černý rybíz	5.53	716.905			0.87342			79.3239					
Černý rybíz	5.82	813.206			1.46907			85.7523			1.91546		
Jírovec maďal	6.61	8.50911	8.0823 ±	0.61726	2.68185	2.25913 ±	0.43204		62.3215 ±	5.46612	0.44144	0.46836 ±	0.09478
Jírovec maďal	5.74	7.51189	RSD%	7.63722	1.54856	RSD%	19.1242	58.5488	RSD%	8.77084	0.54002	RSD%	20.2375
Jírovec maďal	5.9	7.68258						63.0841			0.6125		
Jírovec maďal	5.51	7.61565			2.29909			70.9036			0.35892		
Jírovec maďal	5	9.09225			2.507			56.7496			0.38893		
Lípa srdčitá	6.04	1.07007	1.70426 ±	0.33979	2.20695	2.10154 ±	0.16973	6.88493	5.56118 ±	1.22393	4.37964	4.22361 ±	0.55327
Lípa srdčitá	5.05	1.75629	RSD%	19.9378	2.27505	RSD%	8.07659	3.88376	RSD%	22.0085	3.89446	RSD%	13.0995
Lípa srdčitá	5.18	1.73731			2.22085			4.91236			3.72799		
Lípa srdčitá	5.23	1.87749			1.83423			6.56367			5.23939		
Lípa srdčitá	5.38	2.08016			1.97063						3.87658		
Břiza bělokora	5.49	57.5139	70.6726 ±	6.73141	27.7217	27.368 ±	5.43694	3879.41	4644.96 ±	608.18	9.80747	8.271 ±	1.31966
Břiza bělokora	5.39	71.8004	RSD%	9.52477	32.7128	RSD%	19.8661	4995.33	RSD%	13.0933	9.87254	RSD%	15.9553
Břiza bělokora	5.88	73.0829			33.9634			5151.85			7.39405		
Břiza bělokora	6.05	75.3316			21.3592			5262.23			6.66264		
Břiza bělokora	5.93	75.6344			21.0828			3936			7.61828		
Jinan dvoulaločný	5.5	7.82695	6.68725 ±	0.65357	1.46473	1.09431 ±	0.24753	286.318	260.259 ±	41.3565	5.62391	4.08403 ±	0.84177
Jinan dvoulaločný	5.23	6.60253	RSD%	9.77333	1.11582	RSD%	22.62	206.729	RSD%	15.8905	4.1132	RSD%	20.6114
Jinan dvoulaločný	6.1	6.4084			0.7696			311.359			3.20027		
Jinan dvoulaločný	5.58	6.77388			0.88607			215.911			4.01977		
Jinan dvoulaločný	5.69	5.82447			1.23533			280.979					

Příloha č. 2: Souhrnné výsledky kvantifikace brassinosteroidů v pupenech studovaných rostlin

Tabulka S 2: Kvantifikace BRs systémem UHPLC-MS/MS

mg (DW)	Brassinolide		28-norbrassinolide		Castasterone		28-homocasterone		28-norcastasterone		Typhasterol		
	pmol/g DW	Average±SD	pmol/g DW	Average±SD	pmol/g DW	Average±SD	pmol/g DW	Average±SD	pmol/g DW	Average±SD	pmol/g DW	Average±SD	
ječáb aronie	6.97	4.9460	7.8143 ± 2.6973	0.1832	0.1968 ± 0.0538	35.5346	43.8996 ± 8.1144	117.2316	105.2462 ± 9.8409	109.6421	116.4946 ± 6.6729	129.5961	116.1189 ± 7.3454
ječáb aronie	6.42	11.0161	RSD% 34.5180	0.2226	RSD% 27.3462	51.9971	RSD% 18.4841	115.4123	RSD% 9.3503	107.4895	RSD% 5.7281	111.0424	RSD% 6.3258
ječáb aronie	6.39	9.9461		0.2637		36.6996		102.8030		119.9979		118.2583	
ječáb aronie	5.6			0.1177		55.1817		99.6959		124.4042		109.7885	
ječáb aronie	5.63	5.3488				40.0848		91.0885		120.9392		111.9091	
jasan ztepilý	5.86	2.3104	3.9334 ± 1.2351	0.0221 ± 0.0058	7.0687	10.7109 ± 2.8663	50.9061	47.6215 ± 7.6848	0.9521	1.1889 ± 0.2962	41.5393	37.1613 ± 4.3780	
jasan ztepilý	5.18		31.4002		26.1681		26.7604		16.1373		24.9137		11.7812
jasan ztepilý	5.55					10.9913		52.0858					
jasan ztepilý	5.34	4.1859		0.0163		34.3281		34.3281					
jasan ztepilý	5.28	5.3039		0.0278		14.0728		56.4136		1.6065		32.7832	
ostružina křovitá	6.57	5.6917	4.5074 ± 0.7933	0.3487	0.2782 ± 0.0705	18.3492 ± 3.5405	133.9426	99.0082 ± 21.2455	190.6351	195.0963 ± 19.0605	37.5043	39.4908 ± 5.2304	
ostružina křovitá	6.29		17.5993	0.2078	25.3220	15.9980	19.2951	15.5470	21.4583	90.9099	9.7698	37.0734	13.2446
ostružina křovitá	5.86	4.0242				23.3532		76.5287		178.6654		45.4182	
ostružina křovitá	5.88	4.7205				15.6963		93.8230		183.1952		45.4632	
ostružina křovitá	5.57	3.5933						91.7384		232.0757		31.9947	
líška obecná	5.59	1.0878	1.0400 ± 0.0340	0.0105 ± 0.0019	15.6085	17.4072 ± 2.4923	7.7993	11.4501 ± 3.8975	3.7756	3.9977 ± 1.5942	19.9276	18.6718 ± 3.1458	
líška obecná	5.11		3.2678		20.9316	14.3179	15.5470	34.0393		39.8789		12.0797	16.8478
líška obecná	6.45			0.0124				16.8146				19.0111	
líška obecná	6.26	1.0210		0.0086		15.6814		8.8455		2.1657		12.7309	
líška obecná	6.07	1.0113						8.2440		6.0518		19.6096	
ptačí jeřáb	5.92	20.1239	17.5682 ± 2.6661	0.3140	0.2402 ± 0.0704	29.4646	22.7466 ± 4.2360	42.3709	51.7010 ± 8.2376	181.4651	157.3728 ± 21.3065	185.0222	137.4846 ± 29.1219
ptačí jeřáb	6.78	13.0918	15.1757	0.2435	29.3114	20.9316	18.6228	15.5470	15.9331	163.4111	13.5389	125.8101	21.1819
ptačí jeřáb	6.75					22.8421		62.7890		128.4587		114.0587	
ptačí jeřáb	6.69	18.6239		0.1262		20.6484		45.1037		136.5633		106.5862	
ptačí jeřáb	5.11	18.4332		0.2771		18.0314		48.0354		176.9655		155.9457	
vrba bílá	6.56		1.6898 ± 0.1981	<LOD		37.9220 ± 6.6930	18.6473	22.6534 ± 3.9311		3.2378 ± 1.0301	80.0976	89.8453 ± 7.9183	
vrba bílá	5.01	1.3698	11.7235			32.1241		26.3371		2.9518		8.8133	
vrba bílá	5.45	1.9100				36.9364		17.6494		1.8344		86.0544	
vrba bílá	6.93	1.7163				49.1109		18.8056		3.4634		91.6262	
vrba bílá	5.35	1.7631				33.5167				4.7014		101.6029	
javor babyka	5.73	4.9329	5.2027 ± 0.7383	<LOD		63.5804	62.1341 ± 10.5121	171.6408	181.7291 ± 23.0404	5.7299	5.9407 ± 1.2230	47.6640	55.4149 ± 4.9876
javor babyka	5.65		14.1907			51.5095	16.9184	15.0706	12.6785	8.2788	20.5876	58.1721	9.0004
javor babyka	5.75	6.2111				54.7876		160.8847		4.7512		61.0227	
javor babyka	5.31							158.1250		5.7097		54.8009	
javor babyka	6.04	4.4640				78.6590		202.9243		5.2339		89.6296	
ostružník maliník	5.81	6.5087	4.4006 ± 1.4991	0.6962	0.8318 ± 0.1141	20.7685 ± 1.9431	17.0289	26.8253 ± 5.3381	84.3572	117.7276 ± 19.6050	50.8011	46.0216 ± 5.0625	
ostružník maliník	5.59		34.0648	1.0077	13.7177	22.2078	9.3562	26.5932	19.8994	143.9089	16.6528	46.1362	11.0002
ostružník maliník	6.2	3.4222		0.9173		20.3577		29.3448		120.5644		49.4823	
ostružník maliník	5.91	2.6214		0.7521		22.7376		28.1393		112.6507		47.2481	
ostružník maliník	5.32	5.0501		0.7857		17.7710		33.0203		127.1570		36.4401	
ěrný ryбіz	5.79		23.3670 ± 2.8369	0.1632	0.1101 ± 0.0376	85.1821 ± 15.0575	325.5254	345.7358 ± 36.6489	17.6624	25.3745 ± 4.5693	81.2243	84.2124 ± 6.7045	
ěrný ryбіz	6.62	25.2049	12.1406	0.0829	34.1551	75.2443	17.6768	364.1183	10.6003	25.2046	18.0073	75.1415	7.9614
ěrný ryбіz	6.52	19.3596				94.8734		286.2991		31.8605		81.1248	
ěrný ryбіz	5.77	25.5365				104.2025		359.6357		25.1124		93.9417	
ěrný ryбіz	6.26			0.0840		66.4082		393.1003		27.0327		89.6296	
jírovec maďal	6.26		5.9426 ± 1.1534	0.4791	0.5500 ± 0.0534	86.9440	100.8086 ± 12.1522	98.5511	97.0311 ± 11.0723	32.6336	33.0255 ± 1.5316	53.0980	51.4572 ± 2.2932
jírovec maďal	6.15	5.8543	19.4090	0.5449	9.7142		12.0547		11.4111		4.6377	52.5254	4.4566
jírovec maďal	5.59	7.3973		0.6297		109.9582		78.6852		35.0663		54.0547	
jírovec maďal	6.06	4.5762		0.5465		90.8445		103.2145				49.7078	
jírovec maďal	5.94					115.4878		107.6736		31.3765		47.8999	
lípa srdčitá	5.28	4.6261	3.9276 ± 1.4316	0.0679 ± 0.0054	11.7693	12.6913 ± 1.2945	6.7449	7.6855 ± 1.5032	4.5454	5.8180 ± 0.9094	66.4086	65.6257 ± 8.5342	
lípa srdčitá	5.36	1.9328	36.4483	0.0618	7.9637	11.7826	10.2002	19.5589	6.6150	15.6311		13.0043	
lípa srdčitá	5.83					11.7826		5.9296				79.2330	
lípa srdčitá	5.46			0.0749		14.5221		9.8808		6.2937		57.4265	
lípa srdčitá	5.88	5.2241		0.0670				8.1868				59.4346	
jínan dvoulaločný	5.77	6.1188	5.2293 ± 1.8869	0.0856	0.1206 ± 0.0334	20.5568	27.0440 ± 3.7900	75.8776 ± 5.0599	17.1633	16.0179 ± 3.3531	85.3542	63.6935 ± 12.2248	
jínan dvoulaločný	5.64	7.6457	36.0829		27.7327	28.2932	14.0142	6.6685	14.0751	20.9338	66.0480	19.1932	
jínan dvoulaločný	6.03					29.4483		73.7350		11.8614		52.2717	
jínan dvoulaločný	5.35	2.5403		0.1656		29.8779		77.0490		15.2094		51.7954	
jínan dvoulaločný	5.37	4.6124		0.1104				83.2905		21.7800		62.9984	

Příloha č. 3: Fotografie vybraných druhů rostlin



Obrázek S 1: Fotodokumentace vybraných pupenů testovaných rostlin (a-bříza bělokorá, b-černý rybíz, c-javor babyka, d-jeřáb aronie, e-ptačí jeřáb, f-jinan dvoulaločný, g-jírovec maďal, h-olše lepkavá, ch-topol černý, i-vrba bílá)