



Středoškolská technika 2023

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Vyhledávání potenciálních lektinů v rostlinách

Veronika Bialoboková

Střední průmyslová škola chemická
Vranovská 65, Brno

Anotace

Tato práce je zaměřena na hledání lektinů v semenech rostlin. V práci je stručné shrnutí lektinů, potom praktická část a následně výsledky a diskuze. K experimentu byla využita semena z rostlin: rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*), rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*), zmarlika Jidášova (*Cercis siliquastrum*), bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*) a orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*). Lektiny byly vyhledávány pomocí aglutinačních a hemaglutinačních metod. Pro provedení byly použity červené krvinky a kvasinky. Nutno podotknout, že se jedná o pionýrský výzkum, protože tato semena ještě nikdo netestoval..

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Vyhledávání potenciálních lektinů v rostlinách

Veronika Bialoboková
Jihomoravský kraj

Brno 2022/23

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Vyhledávání potenciálních lektinů v rostlinách Search for potential lectins in plants

Autorka: Veronika Bialoboková

Škola: Střední průmyslová škola chemická Brno příspěvková organizace, Vranovská 65, Brno-Husovice

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: Mgr. Lenka Malinovská Ph.D.

Vedoucí práce: PhDr. Marcela Helešicová

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 30.1. 2023 Veronika Bialoboková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat za odborný dohled při zpracování SOČ doktorce Lence Malinové a její trpělivosti, kterou se mnou měla a umožnění práce v laboratoři na Masarykově univerzitě v Brně. Dále doktorce Marcele Helešicové za záštitu v SPŠCHBR. Dále mojí rodině a kamarádům za jejich rady a psychickou podporu.

Anotace

Tato práce je zaměřena na hledání lektinů v semenech rostlin. V práci je stručné shrnutí lektinů, potom praktická část a následně výsledky a diskuze. K experimentu byla využita semena z rostlin: rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*), rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*), zmarlika Jidášova (*Cercis siliquastrum*), bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*) a orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*). Lektiny byly vyhledávány pomocí aglutinačních a hemaglutinačních metod. Pro provedení byly použity červené krvinky a kvasinky. Nutno podotknout, že se jedná o pionýrský výzkum, protože tato semena ještě nikdo netestoval.

Cíl práce

Je pomocí aglutinačních a hemaglutinačních metod zjistit, zda se lektiny vyskytují v semenech rostlin: rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*), rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*), zmarlika Jidášova (*Cercis siliquastrum*), bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*) a orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*).

Klíčová slova

aglutinace, bauhinie, hemaglutinace, lektiny, proteiny, rozrazil, zmarlika

Annotation

This paper focuses on finding lectins in plant seeds. A short summary of the basic properties of lectins is presented, followed by a practical part, the results, and discussion. For the experiment, seeds from the following plants were used: the heath speedwell (*Veronica officinalis*), the germander speedwell (*Veronica chamaedrys*), the Judas tree (*Cercis siliquastrum*), the yellow bauhinia (*Bauhinia tomentosa*), and the orchid tree (*Bauhinia purpurea*). Lectins were searched for by using the agglutination and hemagglutination methods. For the procedure, red blood cells and yeast were used. It should be noted that this is a pioneering research as no one has tested these seeds yet.

The aim of the work

The aim of the study is to determine whether lectins are present in the seeds of the following plants: the heath speedwell (*Veronica officinalis*), the germander speedwell (*Veronica chamaedrys*), the Judas tree (*Cercis siliquastrum*), the yellow bauhinia (*Bauhinia tomentosa*), and the orchid tree (*Bauhinia purpurea*) using the methods of agglutination and hemagglutination.

Keywords

agglutinates, bauhinia, hemagglutination, Judas tree, lectins, proteins, veronica

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Lektiny.....	9
2.1. Objev lektinů.....	10
2.2. Rozdělení lektinů.....	11
2.2.1. Rostlinné lektiny.....	12
2.2.2. Živočišné lektiny.....	12
2.2.3. Houbové lektiny.....	12
2.2.4. Bakteriální lektiny.....	13
2.2.5. Virové lektiny.....	13
2.3. Krev.....	13
2.3.1 Krevní skupiny.....	15
2.3.2 Dieta podle krevních skupin v návaznosti na inerakce s lektiny.....	16
2.4. Informace o využitých rostlinách.....	18
2.4.1 Rozrazil lékařský (<i>Veronica officinalis</i>).....	18
2.4.2 Rozrazil rezekvítek (<i>Veronica chamaedrys</i>).....	19
2.4.3 Zmarlika Jidášova (<i>Cercis siliquastrum</i>).....	20
2.4.4 Bauhinie plstnatá (<i>Bauhinia tomentosa</i>).....	21
2.4.5 Orchidejový strom (<i>Bauhinie purpurea</i>).....	22
3. praktická část.....	23
3.1 Metodika.....	23
3.2.1 pomůcky.....	23
3.2 pracovní postup.....	24
3.2.1 získání a popis semen.....	24
3.2.3 Zpracování semen.....	27
3.2.2 Příprava krve.....	32
3.2.3 Provedení hemaglutinace s červenými krvinkami.....	32
3.2.4 Příprava kvasinek.....	33
3.2.5 Provedení aglutinace s kvasinkami.....	34
4. Vyhodnocení výsledků.....	34
4.1 hemaglutinace.....	34
4.2. Aglutinace s kvasinkami.....	38

5. Diskuze.....	41
6. Závěr.....	42
7. Použitá literatura.....	43

1. ÚVOD

Tato práce je zaměřena na lektiny. Lektiny jsou proteiny neimunitního původu se schopností vázat cukry. Moje práce se zabývá vyhledáváním lektinů v rostlinách, protože mezi moje koníčky patří floristika. Proč jsem zvolila zrovna lektiny? K tomuto tématu jsem se vlastně dostala úplně náhodou. Byla jsem na workshopu (Vědecké projekty pro středoškoláky) zaměřeném právě na výběr odborných prací, který nám doporučil náš vyučující Ing. Tomáš Buriánek. Nejvíce mne zaujalo právě toto téma. Nejspíše díky poutavé prezentaci, která nabízela jeho zpracování, a tak jsem se přihlásila. Tímto začal můj zájem o téma lektiny.

Co si představit pod pojmem lektiny? Já jsem o nich také dřív neslyšela, a přitom jsou všude kolem nás, jen o nich nevíme. Jedná se o specifické proteiny, které mají schopnost vázat se na určitý cukr. Název dostali podle svého chování. Pochází z latinského “legere” což znamená „vybírat si”. Jsou velice různorodé. Mají různé funkce, od zásobních látek přes schopnost vázat se na buňky, až po toxiny atd. Lektiny se vyskytují ve všech typech organismů.

Vysoký výskyt lektinů je v luštěninách (fazole, hrách, sója, čočka), obilovinách, lilkovitých rostlinách (paprika, rajče, lilek, mochně, ale i rulík zlomocný), bylinkách.

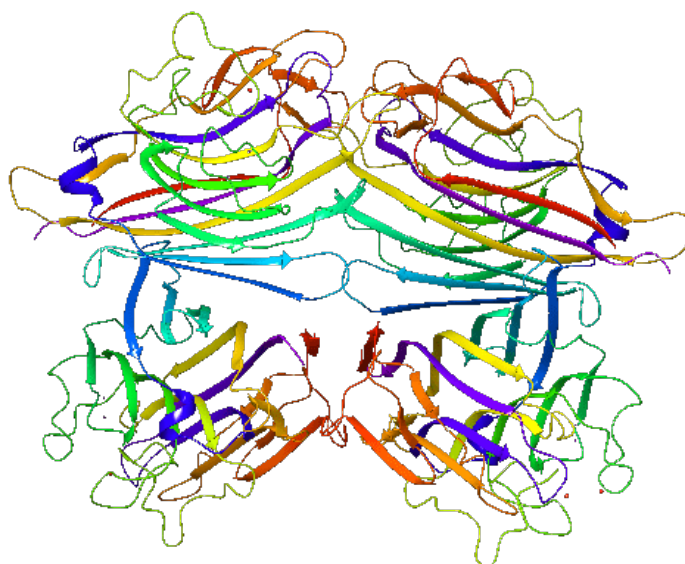
Funkce lektinů jsou odlišné. Na jednu stranu to může být léčivá látka, používaná v medicíně, na druhou jed. Zlikvidovat se dají jednoduše, protože jsou to bílkoviny, stáčí je zahřát na vyšší teplotu (cca 60 °C). Při této teplotě většina bílkovin denaturuje a stávají se nefunkčními.

2. LEKTINY

Lektiny jsou proteiny (bílkoviny). Umí rozpoznávat cukry (monosacharidy, oligosacharidy). Uplatnění mají v imunitním systému, komunikaci buněk, patogenezi. Typickou vlastností pro lektiny je schopnost aglutinovat (schopnost tvořit shluky). Pokusy se většinou provádějí na červených krvinkách (erytrocyty), protože jsou jednoduše sehnatelné a dostupné. Červené krvinky na svém povrchu obsahují sacharidy, které mohou lektiny vázat [1].

Lektiny bývají multivalentní, to znamená, že na sebe můžou vázat víc buněk naráz a shlukovat je. Toho se využívá pro detekci lektinu. Ovšem existují i lektiny, které červené krvinky “rády” nemají. Nejsme schopni je tímto způsobem detekovat a musíme použít jiné metody výzkumu.

Při interakci lektinů se sacharidem se uplatňují polární interakce, vodíkové můstky, někdy napomáhají ionty kovů (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), mohou interagovat i s vodou. Vazba mezi lektinem a sacharidem je považovaná za slabou [2].



Obr. č. 1: Příklad lektinu (tetramerový lektin z pistácie) [3]

Lektinům a jejich interakcím se sacharidy vědci bohužel přikládali velmi malou váhu. Teď po provedených výzkumech si teprve uvědomujeme jejich podstatu a důležitost [4].

2.1. Objev lektinů

Lektiny objevil Petr Hermann Stillmark. Byl to baltsko-německý mikrobiolog. Narodil se 22. července 1860 v Penze (Rusko) a zemřel 23. června 1923 v Pärnu (Estonsko). Pracoval pod vedením profesora Rudolfa Koberta. Lektiny objevil při své doktorské práci ukončené

v roce 1888 na univerzitě v Dorpatu (dnes se jedná o Tartu v Estonsku). Snažil se přijít na to, proč je skočec obecný toxický. Podařilo se mu izolovat ricin, což byl první objevený lektin [5].



Obr. č. 2: Fotografie Petera Hermanna Stillmarka [6]

Skočec obecný (*Ricinus communis*) je jedovatá rostlina. Pojmenoval ho už v 18. století Carl von Linné podle jeho pichlavým výběžkům a také podle tvaru semen. Dostal název ricinus, což v překladu z latiny znamená “klíšť”. Jedná se o okrasnou rostlinu z čeledi pryšcovitých, mylně ji někteří řadí do luštěnin, protože jejím semenům se říká “fazole” [7].

Pochází z Afriky. Dorůstá výšky 3-5 metrů a má typické tvarování listů (podobají se kaštanům, tedy jírovci maďalu), podle fialových stonků a výrazně červených plodů ho poznáte hned. Sice je tato rostlina velmi jedovatá právě kvůli obsahu ricinu, ovšem po tepelné úpravě se dá využívat její olej v lékařství (projímadla), kosmetice (masky, krémy, vyživovací oleje), ale také v průmyslu jako příměsí svíček či i motorových olejů, další použití je ve výrobě pesticidů proti hlodavcům a hmyzu [8].



Obr. č. 3: Fotografie skočce obecného [9]

2.2. Rozdělení lektinů

Lektiny se dělí, podle toho, z kterého organismů pocházejí a jaký typ cukru váží. Dlouhou dobu si vědci mysleli, že lektiny se vyskytují jen v rostlinách. Po dalších studiích se došlo k závěru, že lektiny obsahuje každá živá soustava.

Lektiny můžeme rozdělit na základě toho, jaký cukr upřednostňují. Lektiny vázající se na:

- D-manosu,
- L-fukosu,
- N-acetyl-D-glukosamin,
- D-galaktosu,
- N-acetyleneuraminovou kyselinu [10].

Další rozdělení lektinů je podle původu:

- rostlinné,
- živočišné,
- houbové,
- bakteriální,
- virové [1].

2.2.1. Rostlinné lektiny

Rostlinné lektiny jsou zatím nejvíce prozkoumané [2]. Mezi hlavní funkce rostlinných lektinů patří jejich role zásobních látek v semenech [4]. Váží spektrum sacharidů a jsou celkem snadno izolovatelné ze semen.

Další důvodem, proč si rostliny tvoří lektiny je ten, že se tím brání proti škůdcům, jak vnitřním, tak vnějším. U některých rostlin se také podílejí na symbióze s bakteriemi

vzájícími vzdušný dusík. Do styku s rostlinnými lektiny se dostáváme každodenně, protože jsou součástí naší potravy. Jak jsem zmínila na začátku, fazole, ale i další luštěniny, jich mají velké množství a za syrova mohou být nebezpečné. Objevují se i v obilovinách a různých dalších plodinách (rajčata, cibule, brambory atd.). Uvádí se, že lektiny z česneku jsou dobré pro naši střevní mikroflóru, fungují na bázi probiotik [10].

2.2.2. Živočišné lektiny

Lektiny u živočichů mají spoustu funkcí. Objevují se v membráně buněk nebo volně v krvi. V membráně slouží k zachytávání glykosylovaných látek (cukerných zbytků). Další lektiny se podílejí na obranyschopnosti organismu proti bakteriím, virům či dokonce i houbám (plísním). Naváží se na cukry na povrchu patogenu a aktivují obranu [10].

Objevuje se možnost využití lektinů v biomedicině. Příkladem by mohlo být zastavování škodlivých patogenů, které napadají buňku. Rovněž byl objeven hadí lektin, který je schopný napomáhat likvidaci nádorových buněk [2].

2.2.3. Houbové lektiny

Výzkumníci hledali původně lektiny hlavně v rostlinách a živočiších, ale mnoho se jich vyskytuje i u hub. Lektiny u hub mohou být velice stabilní a to i v extrémních podmínkách, jak teplotních tak pH. Největší rozptyl byl zaznamenán u houby lesklokorka (*Ganoderma capense*), 4-11 pH a zvládne teplotu 100 °C. Nejvíce houbových lektinů bylo získaných z plodnic hub, ovšem některé se vyskytují pouze v myceliu nebo se objevují v obou. Proč houby mají lektiny úplně nevíme, ale předpokládá se, že podporují růst. U hub, které mají toxické lektiny, by se jako u rostlin dalo předpokládat, že je využívají na obranu proti organismům, které je napadají. Houby lektiny mohou také využít i jako zásobní látky. Další využití u hub může být při symbióze. Příkladem může být mykorrhiza (symbióza mezi houbou a vyšší rostlinou, typickým příkladem je strom), kdy houba pomáhá pomocí svého podhoubí získávat větší množství vody a dalších živin. Rostlina pak poskytuje cukry z fotosyntézy. Typická je pro houby spolupráce s řasami nebo sinicemi, tím tvoří lišejníky [11].

Dnes známe cca 150 000 druhů hub, i s plísněmi a kvasinkami, nedá se předpokládat, že jsme našli všechny a už vůbec ne to, že jsou všechny otestované na lektiny. Doposud bylo houbových lektinů nalezených 194 a jen u 35 z nich popsána struktura (údaj pro rok 2021). Proto je velice pravděpodobné, že se další lektiny v houbách objeví [2].

Houbové lektiny mají zajímavé vlastnosti, které by se daly v budoucnu využít ve zdravotnictví. Některé mají antivirotické účinky [11].

2.2.4. Bakteriální lektiny

Bakterie lektiny často využívají při napadení hostitelské buňky. Při infekci se musí bakterie přichytit a dostat do organismu. Použije k tomu právě lektiny, které se naváží na cukry, co

jsou na hostitelské buňce. Dnešní moderní medicína se snaží nalézt něco, co by tyto vazby mezi hostitelskou buňkou a bakterií přerušilo a nejlépe jim úplně zabránilo. Nejvíce prostudované lektiny u bakterií jsou z *E. coli* [10].

2.2.5. Virové lektiny

Viry podobně jako bakterie využívají lektiny k tomu, aby infikovaly hostitelskou buňku. Opět pomocí lektinů přilnou na povrch buňky. Například tohoto využívá i lektin z chřipky, který patří k těm nejvýznamnějším z virového světa, a také je zatím nejvíce prozkoumaný. Je to díky tomu, že chřipka je velmi rozšířená nemoc v populaci. [10]

2.3. Krev

Krev je mimobuněčná kapalná tělní tkáň, jedná se o trofické pojivo. U lidí se obnoví až 3x do roka, což je cca 50 ml denně. Obsahuje nejen červené krvinky (obsahují hemoglobin, který váže kyslík), ale i bílé krvinky (obrana organismu), krevní destičky (úločky kostní dřeně, které zabezpečují srážlivost) a plasmu (průhledná nosná tekutina se stálým pH). V těle člověka je krve 4,5 až 6 litrů, to je 6 až 8 % tělesné hmotnosti. Viskozitu má podle aktuálního stavu jedince a také jak moc srdce pumpuje. Má v těle vlastní oběhový systém (cévy a žíly), nevylévá se do organismu, ale cirkuluje [12].









Funkce:

- Homeostatickou:
 1. Drží stálost prostředí v organismu (tlak, pH).
 2. Má stále stejný objem.
 3. Srážlivost (zastavování krvacní pomocí krevních destiček).
- Transportní
 1. Roznášení živin a kyslíku po těle, přenášení odpadních látek do čistících cente (játra, ledviny) a odvádění oxidu uhličitého.
 2. Transport hormonů, vitamínů a dalších látek potřebných pro správnou funkci organismu.
- Ostatní
 1. Imunitní obrana jedince.
 2. Termoregulace.

Existují 4 hlavní krevní skupiny A, B, AB, 0. Jejich antigeny jsou sacharidové struktury na povrchu červených krvinek:

- A má antigen A a protilátky proti antigenu B.
Přítomnost sacharidů: fukosa, N-acetylgalaktosamin.
- B má antigen B a protilátky proti antigenu A.
Přítomnost sacharidů: fukosa, D-galaktosa.
- AB má antigeny A a B, nemá protilátky proti antigenu A a antigenu B.
Přítomnost sacharidů: fukosa, N-acetyl-galaktosamin, D-galaktosa.
- 0 má antigen H a protilátky proti antigenu A a antigenu B.
Přítomnost sacharidů: fukosa. [13]

Právě proto, že červené krvinky mají na svém povrchu sacharidy, mohou je lektiny hemaglutinovat.

	Skupina A	Skupina B	Skupina AB	Skupina 0
Erytrocyty				
Protilátky	 anti-B	 anti-A	Žádné	  anti-A anti-B

Obr. č. 4: Krev a její interakce [14]

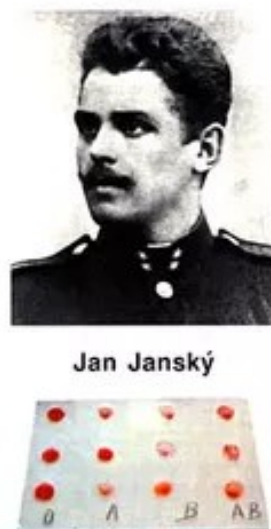
2.3.1 Krevní skupiny

Úplné rozdělení krevních skupin, jak známe dnes, bylo objeveno teprve nedávno a to začátkem 20 století. Něco o nich bylo zjištěno i dříve, ale informace nebyly ucelené a do podrobně popsané a ani nebylo dostatečné vybavení a možnosti výzkumu, jak máme dnes. Před zhruba 100 lety se o prvenství objevu bojovalo mezi třemi vědci, a to mezi naším českým Janem Jánským, dále rakouským Karlem Landsteinerem a potom americký vědec William Lorenzo Moss. Objevili je podle všeho nezávisle na sobě. Jánský vystudoval Lékařskou fakultu v Praze, dále nastoupil jako asistent u známého profesora neuropatologie Karla Kuffenera. Pracoval jako lékař na psychiatrické klinice v Praze. Pomáhal při psaní soudních psychiatrických posudků obviněných. V roce 1914 byl jmenován profesorem, i přesto se jako dobrovolník účastnil války, kde 1916 dostal infarkt. Jeho srdeční potíže způsobily i jeho smrt v roce 1921. Ovšem i přes svoje zdravotní problémy byl velmi dobrým lékařem v oblasti psychologie a psychiatrie. Jeho původním cílem bylo zjistit, jak se liší krev zdravých a lidí s duševními problémy. Studii prováděl na klinice, kde pracoval, takže měl

možnost pozorovat více jak 1000 pacientů. Nezjistil, co bylo původně zamyšleným plánem, ale objevil „vzorec“ chování krve, která se dala rozdělit do 4 skupin. Svoje závěry zveřejnil v roce 1907. Z toho se vyklubaly krevní skupiny, jak je známe dnes. Jánský byl velkým fanouškem dárcovství a využívání krevních transfúzí.

Landsteiner už v roce 1900 prohlásil: „ krevní sérum normálního člověka je často schopno shlukovat červené krvinky jiného zdravého jedince“. Pokusy prováděl jenom s krví svých kolegů, cca 20 jedinců. V roce 1901 představil 3 krevní skupiny. Landsteiner za ni dostal Nobelovu cenu v roce 1930, ale toho už se Jánský nedožil, protože zemřel vcelku mladý (48 let) a tato cena se posmrtně neuděluje.

Moss, který se skupinami vystoupil v roce 1910, dospěl ke stejným výsledkům jako Jánský, ale s odlišným označením. V čase, kdy na tom pracoval nevěděl, že něco takového už bylo zjištěno, hlavně kvůli tomu, že v této době nebyla rozvinuta komunikace, jak je dnes. Když zjistil, že něco takového už vypracoval Jánský, uznal jeho prvenství a uvedl ho i do svojí práce. I americká lékařská komise uznala Jánského jako objevitele krevních skupin, i když Landsteiner přišel s touto teorií jako první a také následně dostal Nobelovu cenu. Jednu dobu se uváděli všichni tři jako objevitelé krevních skupin. Dnes se lékaři nedokážou dohodnout, kdo krevní skupiny objevil [15].



Obr. č. 5: Fotografie Jana Jánského s destičkou krevních skupin [16]

2.3.2 Dieta podle krevních skupin v návaznosti na inerakce s lektiny

S touto dietou přišel v roce 1996 naturopraktický lékař Peter D'Adamo. Teorie je založena na tom, že lektiny které jíme, by mohly interagovat s našimi červenými krvinkami, podle toho jakou krevní skupinu máme. Tak můžou vznikat různé sraženiny, což by mohlo poškodit

tenké střevo. Reálně je prokázáno toto nebezpečné shlukování jen pro pár lektinů, a to v většinou v syrových potravinách (tepelnou úpravou se zničí), nebo těch co jsou jedovaté.

Vychází se z toho, že krevní skupinu máme podle našich předků a jejich způsobu života.

U krevní skupině A se vychází z toho, že předci byli zemědělci a pěstitelé, proto by jim měla sedět převážně rostlinná strava. Měli by se vyhýbat „toxickému červenému masu“. Podobá se vegetariánské stravě.

Krevní skupina B bere jako výchozí způsob života pastevce. Můžou jíst rostlinou stravu i maso, ale měli by se co nejvíce vyhýbat pro ně nevhodnému kuřecímu a vepřovému masu. Z části si mohou dát mléčné výrobky. Z rostlinné stravy by si měli odeprít pšenici, kukuřici, čočku a rajčata.

AB krevní skupina se bere jako kombinace mezi A a B. Tedy spojení zemědělského a pasteveckého života. Doporučeno je jíst hodně mořské plody, tofu, mléčné výrobky, luštěniny a obiloviny. Oproti tomu omezit fazole, kukuřici, hovězí a kuřecí maso.

Pro 0 se přiřazuje lovec, proto by měli vybírat vysoce proteinové produkty: maso, ryby a drůbež, k tomu zeleninu a ovoce. Vyhýbat se obilovinám, luštěninám a mléčným výrobkům. Vystihuje paleo dieta.

O využití této diety se můžeme dohadovat. Některým to pomáhá, jiným ne. Jde o subjektivní pocit pacienta. Nemusí to být spojeno s krevní skupinou, třeba tomuto pacientovi stačilo pouze upravit stravování a zdravě a pravidelně se stravovat. To udělá samo o sobě dost. Nebo jen „omylem“ vyřadí potravinu, na kterou je intolerantní a bude se cítit jako znovuzrozený. Takže pokud vám dieta prospívá, tak ji klidně držte dál, nic tím nepokazíte. Je nutné si hlídat vyváženost stravy a dostatečný přísun všeho, co tělo potřebuje pro správné fungování, ale nemusí mít v tom prsty jenom krevní skupina [17].

2.4. Informace o využitých rostlinách

2.4.1 Rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*)

Rozrazil je bylina z čeledi jitrocelovitých. Vyskytuje se v Evropě až severní Asii. V ČR jej najdeme po celém území. Vyhovují mu slabě vlhké půdy, spíše písčité s kyselějším pH, není náročný na bohatost půdy. Výška stonku je cca 60 cm. Listy má zeleno-stříbrné, vejčité až kopinaté a na koncích mají mírně zoubkovaný okraj. Kvete v červnu až v srpnu. Barva květů je světle modrá až modrofialová. Vytváří střípce, co rostou z pod listů. Po odkvetení vzniká tobolka, která má žlutá semínka. Využit se dá na čaje, saláty, polévky, používá se na popáleniny, ekzémy, vyrážky a ranky. Účinky jsou detoxikace a čištění krve, pomáhá s metabolismem, podporuje dýchací cesty, čistí močové cesty, příznivě ovlivňuje trávicí soustavu, hojí kůži [18].



Obr. č. 6: Fotografie rozrazilu lékařského [19]

2.4.2 Rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*)

Je to vytrvalá bylina opět z čeledi jitrocelovitých. Objevuje se po celé Evropě, i v Turecku, dále na Kavkazu, ale i na Sibiři. Má ráda vlhké a hlinité půdy s velkým obsahem živin. Roste do výšky cca 50 cm. Stopek je porostlý chloupky. U nás je hojně zastoupená. Listy má tmavě zelené, jsou přisedlé a řapíkaté. Konce listů jsou vroubkované. Květenství má od dubna do srpna. Květy kvetou ve střípcích. Zbarvení je tmavomodré s tmavšími žilkami. Občas se vidí čistě bílé. Plod je opět tobolka. Využívá se hlavně na čaje. Účinky se projevují snižováním cholesterolu, pomáhá na astma, hodí se na regeneraci pokožky, stabilizuje zažívání, má močopudné účinky [20].



Obr. č. 7: Fotografie rozrazilu rezekvítku [21]

2.4.3 Zmarlika Jidášova (*Cercis siliquastrum*)

Jedná se o keř až strom. Patří do bobovitých luštěnin. Roste ve Středozeší. Vyhovuje jí teplé podnebí, bývá na kamenitých podkladech. Je dost odolná. Dorůstá až 5-10 m do výšky, kmen bývá nepravidelný a členěný ve více výhonech, kůra je šedohnědá a vypadá jako by byla popraskaná. Listy se objeví až když vyrostou květy, mají srdčítý tvar. Květy tvoří „hrozny“, jednotlivé kvítky připomínají motýlky. Mají jasnou růžovou barvu, popřípadě bílou. Kvetě na přelomu dubna a května. Bývá využívána jako okrasná dřevina, i když se může využívat i v kuchyni. Je spojovaná s lidovou a alternativní medicínou [22].



Obr. č. 8: Fotografie zmarliky Jidášovy [23]

2.4.4 Bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*)

Je to strom patřící také mezi bobovité a pak se řadí i do luštěniny, který dorůstá do výšky 4 m. Najdeme ho od Afriky až po Indii. Potřebuje suchou půdu s dostatkem humusu. Listy tvoří laloky, jsou světle zelené barvy, navíc mají kožku na povrchu, aby se co nejmíň odpařovala voda. Kvete od prosince do března. Květy má výrazně žluté černým středem. Využívá se pro dřevo, co se používá pro stavbu. Květy se využívají v tradiční medicíně i v lékařství [24].



Obr. č. 9: Fotografie bauhinie plstnaté [25]

2.4.5 Orchidejový strom (*Bauhinie purpurea*)

Jde o malý strom patřící do bovitých a opět se zařazuje i do luštěnin. Pochází z jihovýchodní Asie. Má ráda úrodnou půdu, ale bez nadměrné vlhkosti. Listy jsou zelené. Má velmi výrazné květy, které kvetou od září do listopadu. Připomínají nádherné květy orchideje, jsou větší a hezky voní. Barva je od růžové po fialovou. Je zajímavé, že co květ, to jiná kombinace. Využívá se v zahradnictví i k léčbě [26].



Obr. č. 10: Fotografie orchidejový strom [27]

3. PRAKTICKÁ ČÁST

Praktickou část byla provedena na Masarykově univerzitě v biologické laboratoři v září a říjnu 2022. Docházela jsem jednou týdně v úterý. Jeden týden v září jsem si nachystala rozrazilů a pak další týdny je testovala. Potom jsem si v říjnu nachystala vzorky ostatních rostlin a pak je v průběhu měsíce testovala.

3.1 METODIKA

Aglutinace je shlukování částic. Může se jednat o buňky (červené krvinky, kvasinky, atd.). Látky, které aglutinaci způsobují, mohou být protilátky nebo lektiny. Objevili ji Herbert Durham a Max von Gruber v roce 1896.

Aglutinace je už historicky používaná metoda pro detekci lektinů. Je to způsobeno tím, že lektiny interagují se sacharidy, které jsou na povrchu buněk (každá buňka je na povrchu glykosylovaná). Lektiny jsou multivalentní, to znamená, že jsou schopny vázat více buněk naráz, tím je „zesít'ují“, což způsobí aglutinaci.

Aglutinace se využívá, protože je to jednoduchá a levná metoda. Není náročná na provedení. Zabere málo času. Vyhodnocuje se vizuálně a nejsou zapotřebí žádné drahé přístroje [28].

Aglutinace červených krvinek

U červených krvinek se aglutinace nazývá hemaglutinace. Výhodou je, že se dají jednoduše komerčně sehnat. Krev se bere od velkých savců, tedy není problém s množstvím. Dá se použít lidská i zvířecí (ovčí, kraví). Krev pomáhá určit, zda-li je lektin přítomen či nikoliv, ale také blíže specifikovat, jaký sacharid váže (podle toho jakou krevní skupinu hemaglutinuje nejlépe). Lektiny se liší tím, že preferují, různé cukry.

Pro zvýšení účinnosti se krev ošetřuje papainem. Papain je protein, který štěpí další proteiny (proteáza). Na povrchu červených krvinek papain rozštěpí proteiny, díky tomu se po úpravě zpřístupní sacharidy, které protein blokoval. Lektin se pak může lépe navázat [29].

Aglutinace kvasinek

Kvasinky (*Sacharomyces cerevisiae*) patří mezi jednobuněčné organismy, řadí se do hub. Buňka má tvar kuličky o velikosti 3-15 μm . Množí se pučením. Používají se v potravinářství na kvašení. V buněčné stěně mají polysacharidy (manany). Jsou tedy vhodné pro detekci lektinů, které vážou manosu. Jedná se o jednoduchou metodu. Kvasinky se dají koupit i v běžném obchodě jako pekařské droždí. Metoda je velmi rychlá. Vyhodnocuje se pod mikroskopem [28].

3.2.1 POMŮCKY

- třecí miska a tlouček

- pipety, multikanálová pipeta
- špičky
- kádinky
- váhy, analytické váhy
- odměrný válec
- podložka
- nůž
- kladivo
- alobal
- zkumavky
- držák na zkumavky
- mikrozukavky
- hemaglutinační destičky
- lepicí páska
- permanentní fix
- sítko

3.2.2 Přístroje

- elektromagnetická míchačka – P-LAB
- váha – RoHS Compliance Vibra
- malá centrifuga – Eppendorf, MiniSpin plus
- velká centrifuga – Eppendorf, Centrifuge 5430
- mikroskop – D2L NG, Levenhuk

3.2.3 Chemikálie

- PBS pufr (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,2-7,4)
- červené krvinky z lidské krve
- kvasinky
- destilovaná voda
- lektin pro pozitivní kontrolu – PA-IIL 2,5 mg/ml

3.2 PRACOVNÍ POSTUP

3.2.1 ZÍSKANÍ A POPIS SEMEN

Byla zpracovaná semena z rostlin: rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*), rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*), zmarlika Jidášova (*Cercis siliquastrum*), bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*) a orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*). Semena byla objednaná z online obchodu **Semena.cz**. Dodává je firma SemenaOnline, s.r.o. se sídlem v Praze. Jejich původ je z EU (Evropská unie). Nacházela se v klasické papírové krabičce zajištěná lepicí páskou. V ní byly obálky daných semen rozdělených podle druhů. V obálkách pak byl další sáček se

semeny. Baleno různě podle typu semen. Pro výzkum byly objednány od každého druhu 3 balíčky.



Obr. č. 11: Ukázka balení [30]

Rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*) měl velmi drobná, světle žlutá semena. Balená po cca 30 kusech.



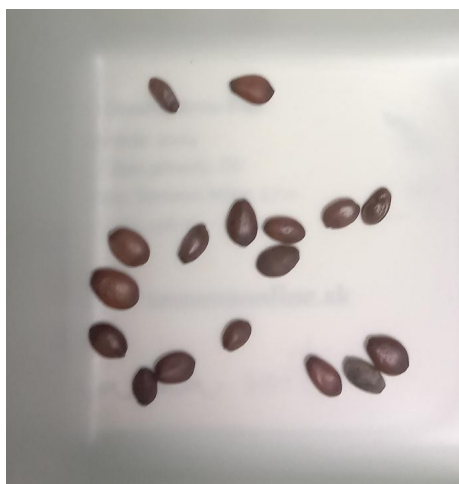
Obr. Č. 12: Semena rozrazilu lékařského [30]

Rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*) měl semena opět velmi malá, ale větší než rozrazil lékařský. Barvu měla světle hnědou až oranžovou. Balení obsahovalo 25 kusů semen.



Obr. č. 13: Semena rozrazilu rezekvítku [30]

Zmarlika Jidášová (*Cercis siliquastrum*) měla semena hnědá, lesklá s hladkým povrchem a protáhlejší, připomínající slzy. Balení obsahovalo 6 kusů.



Obr. č. 14: Semena zmarliky Jidášové [30]

Bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*) měla semena vypadající jako větší čočka i zbarvením a povrchem. Zabalené po 4 kusech.



Obr. č. 15: Semena bauhinie plstnaté [30]

Orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*) měl největší semena. Byla placatá, trochu jako mince. Barva tmavě hnědá. Některá měla na sobě povlak (jeden balíček byl kontaminovaný). Nejspíše šlo o nějakou plíseň.



Obr. č. 16: Semena orchidejového stromu [30]

3.2.3 Zpracování semen

Semena bylo zapotřebí homogenizovat a vyluhovat z nich proteiny, aby je bylo možno otestovat na přítomnost lektinů.

Všechna semena jsem rozdrtila v třecí misce s tloučkem za přítomnosti PBS pufru (využívá se kvůli tomu, že drží stabilní pH), popřípadě dalšími pomocnými postupy.



Obr. č. 17: Třecí miska se semeny [30]

Rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*):

- Použito bylo přibližně 90 kusů semen. Hmotnost činila pouze 16 mg. Musela se vážit na analytických vahách.

- Zpracovala jsem je v třecí misce s 2 ml PBS pufru. Šla dobře rozdrtit.
- Vznikla kašičkovitá šedavá tekutina, kterou jsem dala do zkumavky.



Obr. č. 18: Semena rozrazilu v třecí misce [30]

Rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*):

- Počet semen byl zhruba 75. Váha byla 26 mg. Obsahovala nečistoty, nejspíše pozůstatky z rostliny, ty se tam pravděpodobně dostaly při preparaci semen z květů.
- Byla na drcení náročnější a trvalo mi to delší dobu než u předchozího rozrazilu.
- Vzniklý extrakt byl podobný, ale více do žluta. Dala jsem ho do zkumavky.



Obr. č. 19: Semena rozrazilu po drcení [30]

Zmarlika Jidášová (*Cercis siliquastrum*):

- Pro pokus bylo použito 18 semen. Váha byla 0,41 g.
- Bylo velice zvláštní, že semena měla různou tvrdost.
- K rozdrčení stačila třecí miska s tloučkem, některé kusy šly rozdrtit těžce.
- Použila jsem 8 ml PBS pufru.
- Vzniklou směs jsem přelila do zkumavky.



Obr. č. 20: Rozdrcená semena a jejich zbytky [30]

Bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*):

- Použila jsem 12 kusů semen. Hmotnost byla 0,82 g.
- Drcení bylo náročnější, protože semena byla velice tvrdá.
- Ve třecí misce nešla rozdrtit a podkluzovala.
- Semena jsem zabalila do alobalu a drtila je kladivem. To bohužel nepomohlo.
- Nakrájela jsem je nožem na kousky.
- Šla potom lépe drtit ve třecí misce s 6 ml PBS pufru.
- Takto vzniklou směs jsem přelila do zkumavky.



Obr. č. 21: Nakrájená semena [30]

Orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*):

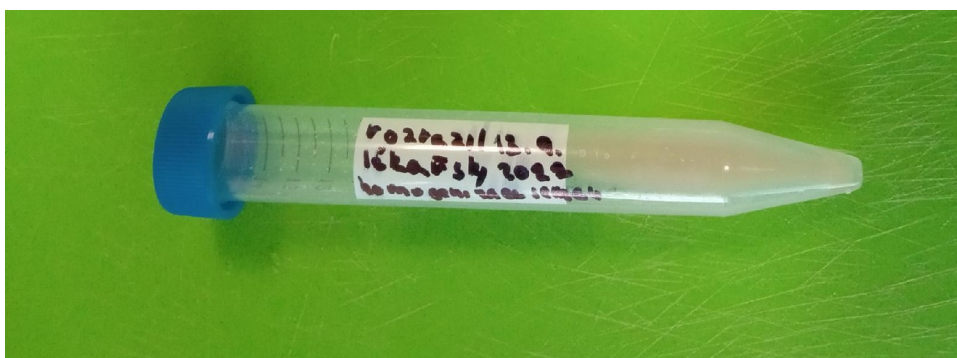
- Použila jsem 12 kusů semen.
- Semena byla omyta vodou a následně destilovanou vodou.
- Rozetřít ve třecí misce šla špatně.
- Rozkrájela jsem je nožem na čtvrtiny a potom už šla ve třecí misce pěkně zpracovat.

- Čím déle se s nimi pracovalo, tím více vsakovala PBS pufr a bobtnala.
- Použila jsem 20 ml PBS pufr.
- Vzniklou směs jsem přelila do zkumavky.



Obr. č. 22: Rozmělněná semena, vznik „kaše“ [30]

Snažila jsem se, aby se z třecí misky povedlo dostat co nejvíce vzorku do zkumavky. Někaké ztráty byly způsobené tím, že tato mazlavá tekutina ulpívala k povrchu třecí misky. Zůstávaly tam i kousky od obalů semen. Zkumavky se vzorky jsem označila.



Obr. č. 23: Ukázka skladování vzorků [30]

Následně byly zkumavky přeneseny do chladicí místnosti (7 °C). Byly připevněné na třepačku lepicí páskou, aby se vyluhovaly proteiny. Po ukončení třepání (cca 24 hodin) byly přesunuty do mrazáku (- 80 °C).

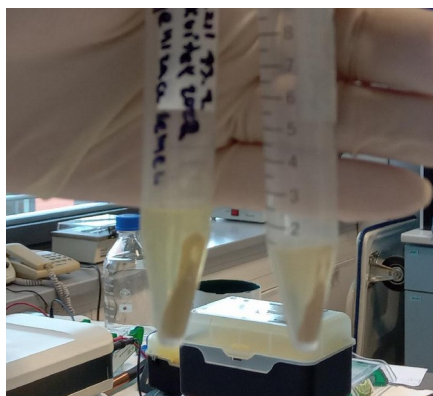


3.3. Testování lektinové aktivity

3.3.1 Centrifugace

Před testováním je nutné vzorek zbavit pevných částí, které zůstaly po drcení semen, aby nepřekážely při provádění experimentu. Využila jsem centrifugaci (oddělení pevných částí od kapaliny pomocí odstředivé síly). Postup odstranění byl následující:

- Vytáhla jsem vzorky z mrazáku a rozmrazila je.
- U rozrazilů jsem stočila celé zkumavky se vzorky na velké centrifuze 60 sekund na nejvyšších otáčkách.
- Následně odebrala 350 μ l do mikrozkuavek.
- Stočila na malé centrifuze na nejvyšších otáčkách 60 sekund.
- Pro ostatní rostliny jsem odebrala 700 μ l vzorku už rovnou do mikrozkuavek, které jsem stočila na malé centrifuze zase na nejvyšších otáčkách 60 sekund.
- Ze stočených mikrozkuavek jsem odebrala 350 μ l supernatantu do další mikrozkuavky. Sediment zůstal na dně.
- Znovu jsem ji stočila na malé centrifuze stočila na nejvyšších otáčkách 60 sekund.
- Takto jsem měla připravený vzorek bez nečistot.



Obr. č. 25: Vzorky po prvním stočení [30]



Obr. č. 26: Vzorky po druhém stočení [30]

Takto připravené vzorky byly následně použité pro provedení experimentu.

3.3.2 Příprava krve

Krev v laboratoři byla komerčně získaná z Tranfúzního a tkáňového centra fakultní nemocnice Bohunice.

K dispozici byly 50% červené krvinky z krevních skupin A, B, 0. Krev nejlépe aglutinuje při 2% zředění. Před každým testováním jsem krev naředila podle potřeby.

3.3.3 Provedení hemaglutinace s červenými krvinkami

Nejdříve jsem připravila hemaglutinační destičku. Snažila jsem se, aby byla co nejčistší a zbytečně se nekontaminovala. Hemaglutinační destička, kterou jsem používala, má rozměry 8x12, tedy 8 řádků a 12 sloupců. Pro každou rostlinu jsem použila 3 řádky, do každého jednu krevní skupinu. Ve 12. sloupci jsem prováděla negativní kontrolu, aby bylo ověřeno zdali je krev v pořádku. Hemaglutinaci jsem provedla následovně:

- Do řádků, které jsem používala, jsem dala do jamky 2. až 12. sloupce 50 μ l PBS pufru 8-kanálovou pipetou.
- V 1. sloupci každého řádku, který jsem používala jsem do jamky dala 100 μ l nezředěného a upraveného vzorku podle kap. 5.3.1.
- Ředící řadu jsem vytvořila tímto způsobem.
- Vzala jsem pipetu nachystanou s objemem 50 μ l a vzala z 1 jamky a dala do 2, promíchala, zase odebrala 50 μ l, které jsem dala z 2 do 3, opět dobře promíchám a pokračovala jsem z 3 do 4.
- Toto jsem provedla až do 11. jamky, kdy jsem z ní vzala 50 μ l a vyhodila je do laboratorního odpadu.
- Provedla jsem toto v každém řádku.
- Potom jsem vzala připravenou krev A, B, 0 ve 2% roztoku viz kap. 5.3.2.
- 50 μ l A jsem dala do každé jamky v řádku určeném pro tuto krevní skupiny.

- Začala jsem od 12. do 1. jamky (pokud bych šla naopak zvyšovala bych si koncentraci).
- To samé jsem provedla s krevními skupinami B a 0.
- Pro každý vzorek jsem tento postup zopakovala.
- Nechala jsem minimálně 30 minut stát.
- Potom jsem provedla vyhodnocení výsledků.

U rozrazilů jsem vyzkoušela i krev ošetřenou papainem, protože byla zrovna v laboratoři k dispozici. Postup byl stejný jak u normální krve. S dalšími rostlinami jsem toto neprováděla, krev upravená papainem už nebyla k dispozici.

Pro bauhinii plsnatou mi nestačila ředící řada, tak jsem provedla to stejné, ale s tím, že jsem rozšířila ředící řadu. (Ředění tedy pokračovalo z poslední jamky jedné řady do první jamky druhé řady. Negativní kontrola byla v poslední jamce druhé řady.)

3.3.4 Příprava kvasinek

Jako kvasinky jsem použila běžné české potravinářské droždí z firmy Uniferm. Zakoupené v obyčejném obchodě. Pro provedení pokusu je potřeba 10% roztok kvasinek. Příprava roztoku je následující:

- Nabrala jsem optimální množství kvasinek, což je 0,15-0,20 gramů.
- Množství PBS pufru jsem si dopočítala, aby to bylo 90 % k množství kvasinek.
- Snažila jsem se kvasinky brát co nejvíce zevnitř kostky, aby nebyly oschlé a mrtvé.
- Kvasinky a PBS pufr jsem smíchala v mikrozkušavce.



Obr. č. 27: Pekařské droždí [30]

3.3.5 Provedení aglutinace s kvasinkami

Experiment byl prováděn pomocí mikroskopu, napojeného na počítač. Zvětšení bylo použito 128x. Mikroskop a sklíčka jsem si nachystala jako první. Potom jsem vzala 10% roztok kvasinek, upravené vzorky, lektin na pozitivní kontrolu (PA-IIL 2,5 mg/ml), mikrozkumavky. Následně jsem postupovala:

- Dala jsem do mikrozkumavky pipetou 10 μ l vzorku, k tomu 10 μ l roztoku kvasinek a promíchala.
- Nechala 2 minuty stát.
- Následně kápala 10 μ l takto nachystaného vzorku na podložní sklíčko a na to jsem přiklopila krycí sklíčko.
- Dala pod mikroskop a pozorovala.
- Udělala jsem si 3 fotografie, pokaždé z jiného místa a uložila.

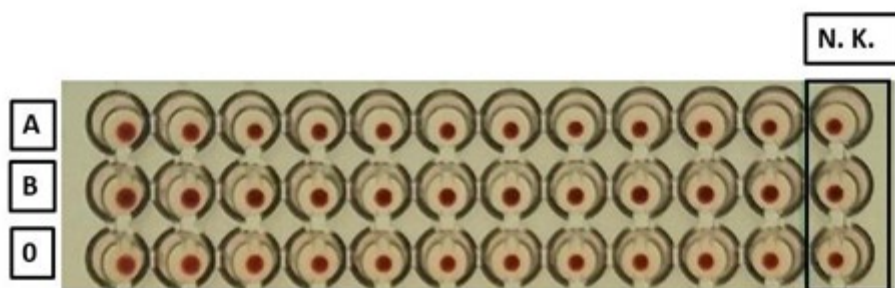
Jako vzorky byly použity: získané extrakty ze semen, roztok lektinu pro pozitivní kontrolu a PBS pufr jako negativní kontrola.

4. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

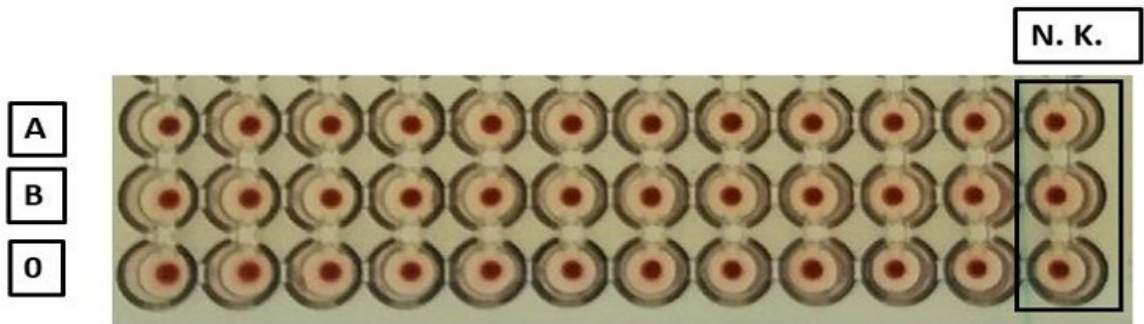
4.1 Hemaglutinace

Rozrazilily

Rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*) a rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*), nevykazovaly známky hemaglutinace ani pro jednu krevní skupinu. Lze tedy říct, že rozrazilily neobsahují lektin, který by interagoval s červenými krvinkami nebo je v tak nízké koncentraci, že se neprojeví.

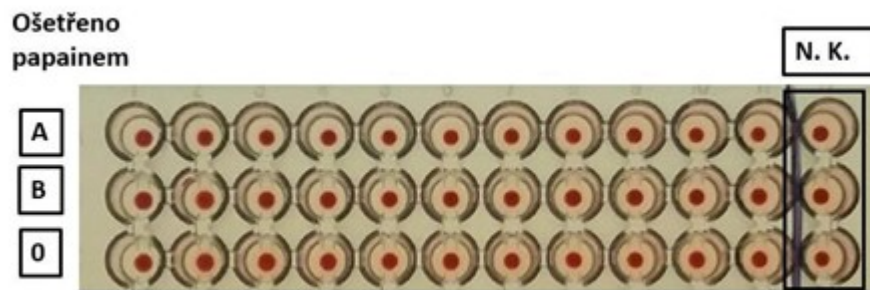


Obr. č. 28: Hemaglutinační destička s testováním rozrazilu lékařského s normální krví [30]

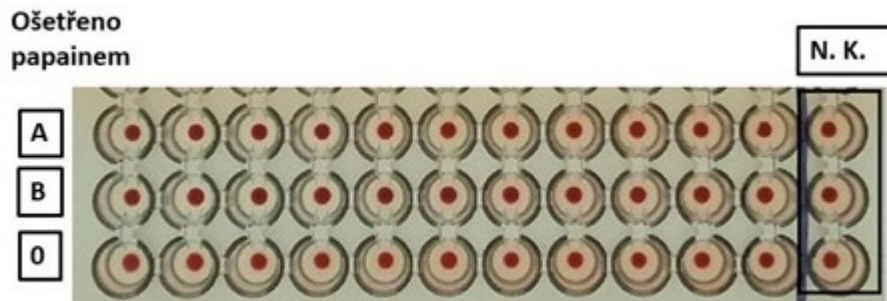


Obr. č. 28: Hemaglutinační destička s testováním rozrazilu rezekvítku s normální krví [30]

Po negativních výsledcích byla použita krev ošetřena papainem, která by mohla být pro lektiny vhodnější. Ale i zde nebyly pozorovány žádné interakce.



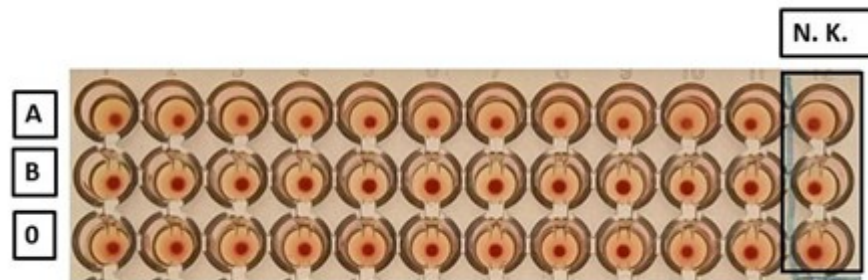
Obr. č. 29: Hemaglutinační destička s testováním rozrazilu lékařského s krví upravenou papainem



Obr. č. 30: Hemaglutinační destička s testováním rozrazilu rezekvítku s krví upravenou papainem [30]

Zmarlika

Zmarlika Jidášova (*Cercis siliquastrum*) nevykazovala žádnou hemaglutinační aktivitu. Důvody proč nehemaglutinuje by mohly být stejné jako u rozrazilů.



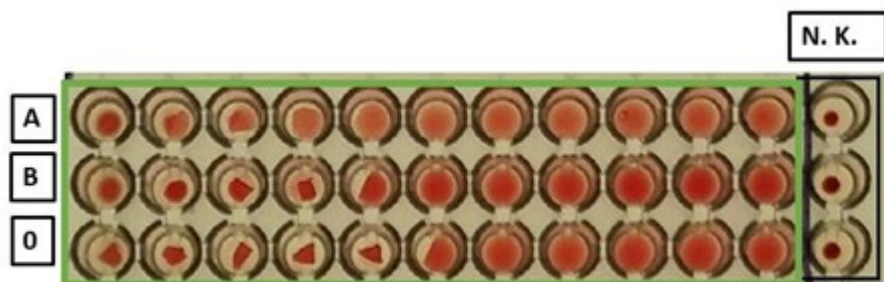
Obr. č. 31: Hemaglutinační destička s testováním zmarliky Jidášové s normální krví [30]

Bauhinie

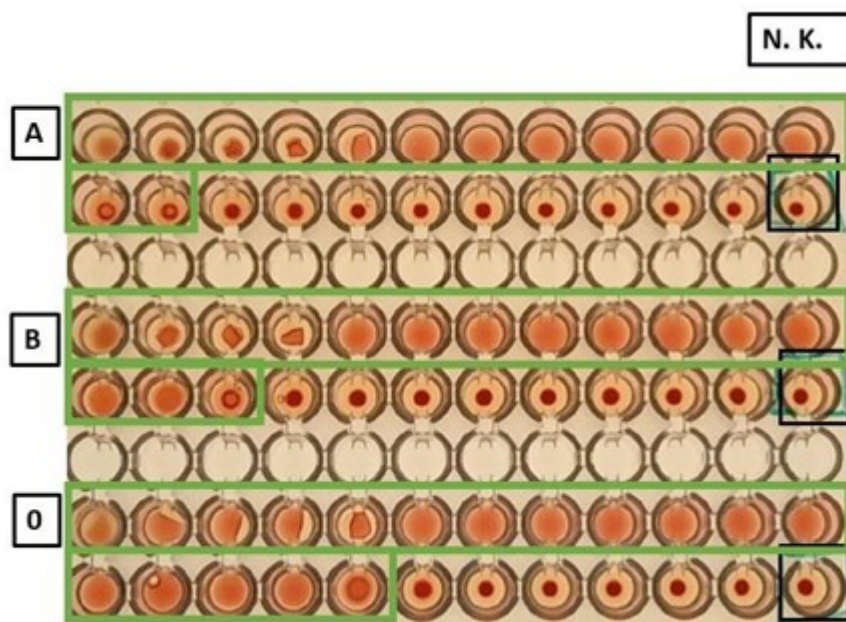
Bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*) a orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*) vykazovaly obě hemaglutinační aktivitu se všemi použitými krevními skupinami. Orchidejový strom měl výrazně nižší hemaglutinační aktivitu než bauhinie plstnatá. Aktivita byla zaznamenána v prvních 2 jamkách. U skupin A a B už v druhé byla slabší. Z toho lze usoudit, že orchidejový strom nejvíce preferuje krevní skupinu 0, protože byla úplná aglutinace ve dvou jamkách. U bauhinie plstnaté byla hemaglutinační aktivita velmi vysoká. V některých jamkách byla krev hemaglutinovaná až tak silně, že se vytvořil makroskopický agregát. Při prvním testu nestačila jedna ředící řada, proto se pokus provedl podruhé, kdy jsem vytvořila delší ředící řadu, ta ukázala, že nejvíce preferuje 0, u ní hemaglutinuje až do 17. jamky. Potom B do 15. jamky a nakonec A do 14 jamky.



Obr. č. 32: Hemaglutinační destička s testováním orchidejového stromu s normální krví [30]



Obr. č. 33: Hemaglutinační destička s testováním baheinie plstnaté s normální krví [30]



Obr. č. 34: Hemaglutinační destička s testováním baheinie plstnaté s normální krví [30]

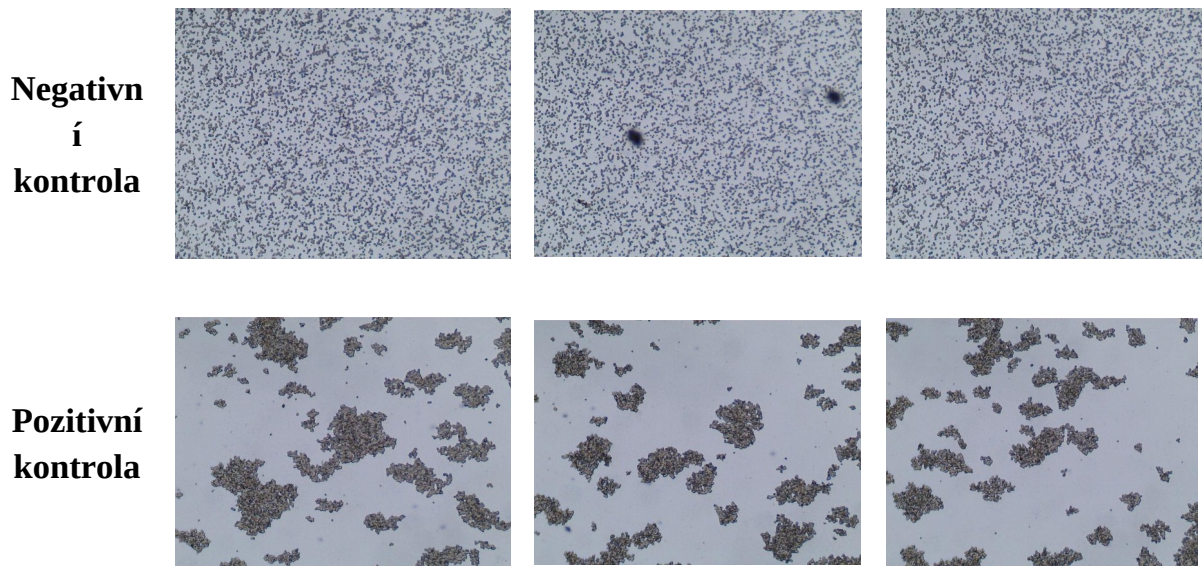
4.2. Aglutinace s kvasinkami

Aglutinace je vhodná metoda pro detekci lektinů vázajících manosu. Před experimentem je nutné provést negativní a pozitivní kontrolu.

Kontroly

Negativní kontrola se provádí z toho důvodu, aby bylo vidět jak kvasinky vypadají za normálních podmínek a jestli se nechovají jak by neměli. Pozitivní kontrola se provádí pro potvrzení schopnosti aglutinovat s již předem izolovaným lektinem v našem případě jde o PA-IIL 2,5 mg/ml.

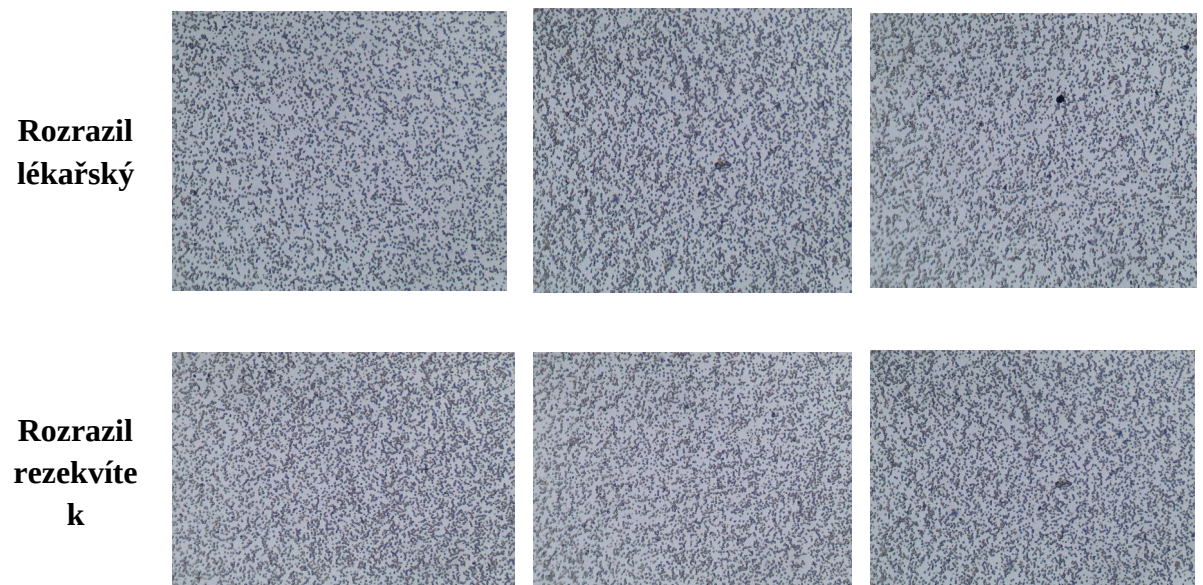
Tabulka 1: Kontroly kvasinek [30]



Rozrazilý

Rozrazilý nevykazovaly aglutinační aktivitu. Nejspíše neobsahují lektin, který by vázal manosu nebo v tak nízké koncentraci, že nejde zaznamenat.

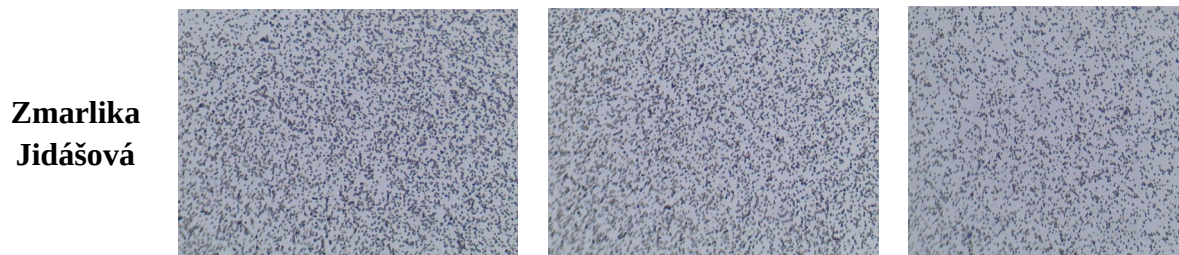
Tabulka 2: Testování rozrazilů kvasinkami [30]



Zmarlika

U zmarliky také nedošlo k žádné aglutinační aktivitě. Platí to stejné, co u rozrazilů.

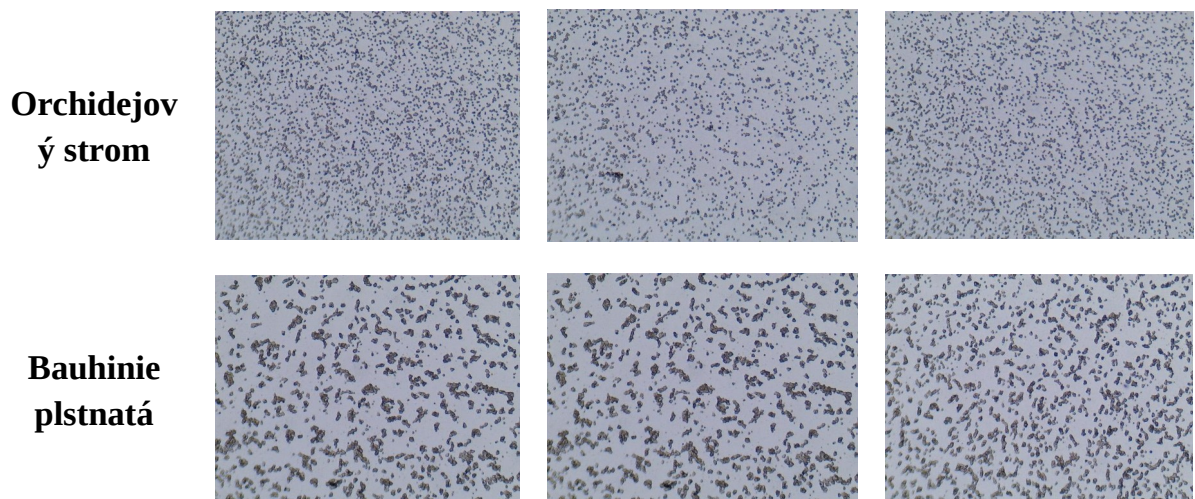
Tabulka 3: Testování zmarliky s kvasinkami [30]



Bauhinie

Orchidejový strom nevykazoval aglutinační aktivitu. Oproti tomu bauhinie plstnatá měla aglutinační aktivitu, lze tedy předpokládat, že obsahuje lektin který aglutinuje jak kvasinky tak krev nebo více lektinů.

Tabulka 4: Testování bauhinií s kvasinkami [30]



5. DISKUZE

Lektiny jsou v dnešní době málo známe. I přes svoji důležitost a velkou zastoupenost se jim přiřkládá malá váha, je to spíš něco vzdáleného. Zanedbávají se nebo se přiřadí k proteinům. Přitom jsou všude kolem nás a běžně se podílejí na věcech úplně běžných pro naše fungování, tedy činnostech v našem životě (od jídla až po onemocnění, které nás sužují).

Výsledky prováděných experimentů byly různé. Dalo se očekávat, že pokud jsou rostliny příbuzné tak budou mít podobné vlastnosti. U rozrazilů se to potvrdilo, oba neaglutinovali krev ani kvasinky. U ostatních 3, které jsou ze stejné čeledě, bylo divné, že se každá chovala jinak. Zmarlika neměla žádnou aktivitu. Orchidejový strom jenom slabě hemaglutinoval. Oproti tomu bauhinie plstnatá měla velmi silné hemaglutinační schopnosti a aglutinovala i kvasinky.

Důvody, proč některé vzorky ze semen neměly aglutinační aktivitu můžou být různé. Buď neobsahují lektin, který by uměl aglutinovat červené krvinky a kvasinky nebo je v tak stopovém množství, že se neprojeví. Řešením tohoto problému by mohlo být, připravit vzorek z více semen, aby měl větší koncentraci nebo semena nechat déle luhovat, či použít jinou metodu drcení. Další možností by bylo použít krev z jiného savce, popřípadě jiné buňky nebo si nachystat různé druhy cukrů a ty postupně otestovat. Popřípadě použít specifické laboratorní metody, které se ve výzkumem centru také provádějí. Ovšem tyto metody jsou dražší a náročné na provedení.

Lektiny u bauhinií by stálo za to prozkoumat. První úkol by byl je izolovat a následně je prostudovat. Lektiny z rodu bauhinie už byly objeveny, jak udává literatura. Uvažuje se o jejich využití v medicíně, protože se využívají v alternativních léčbách, tudíž by to mohlo být nějak propojeno s lektiny. Ve výzkumném centru, kde jsem pracovala, je předpoklad, že se s ní bude i nadále pracovat, a i vypracovávaná bakalářská práce.

Tabulka 5: shrnutí výsledků

Vzorek	hemaglutinace	aglutinace
Rozrazil lékařský	✘	✘
Rozrazil rezekvítek	✘	✘
Zmarlika Jidášová	✘	✘
Orchidejový strom	✓	✘
Bauhinie plstnatá	✓	✓

6. ZÁVĚR

V práci byla zpracovaná rešeršní část k lektinům, jako stručné shrnutí informací a uvedení do problematiky tohoto tématu. Následně praktická část pojednává o tom jak zpracovávat semena z rostlin, které chceme testovat a základní postup pro provedení experimentu. Na konci je vyhodnocení výsledků.

Cíl práce byl, pomocí aglutinačních a hemaglutinačních metod zjistit, zda se lektiny vyskytují v semenech rostlin: rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*), rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*), zmarlika Jidášova (*Cercis siliquastrum*), bauhinie plstnatá (*Bauhinia tomentosa*) a orchidejový strom (*Bauhinia purpurea*). Tyto semena byla zkoumaná na přítomnost lektinů. Semena jsem homogenizovala a následné extrakty testovány, pomocí hemaglutinačních a aglutinačních metod. A to se i podařilo. Zjistili, že u rozrazilu lékařského, rozrazilu rezekvítku a zmarlice Jidášové nejsou lektiny, které by interagovaly s cukry, co byly použity nebo v nízké koncentraci. Pro další výzkum lektinů v těchto semenech bych navrhovala požit jiné metody. Orchidejový strom slabě hemaglutinoval. Lektiny tam tedy jsou ale nejspíše v nízkém množství, proto se nemusely neprojevit. Bauhinie plstnatá vyšla pozitivně jak u hemaglutinace, tak aglutinace, což se předpokládalo. Nejspíše bude obsahovat lektin, který umí vázat jak červené krvinky, tak kvasinky nebo více lektinů z nich každý váže jiný cukr. Její lektiny mají potenciál pro další výzkum a předpoklad pro využití v medicíně. Jistě se na bauhini plstnatou a její lektiny bude zpracovávat další práce. Třeba s ní budu pokračovat já nebo se zadá jako bakalářská práce.

Doufám, že tato práce pomůže při identifikaci lektinů z bauhinie plstnaté a budou se dát použít pro lékařské účely.

Tato práce mě bavila, obohatila mě, co se týče vědomostí, zlepšila jsem si práci v laboratoři i s technologiemi, získala jsem nové informace, které mi budou užitečné i při dalším studiu. Překonala jsem se a vyšla ze svojí komfortní zóny a obětovala jsem tomu svůj čas, který byl dobře využitý. Objevovali se i problémy a také nečekané situace v laboratoři, které jsem musela překonat. Práce v laboratoři mi šla lépe, i když byla náročná, než následné zpracování odborného textu ale i tak mě to naučilo vytrvalosti a tomu, že když člověk chce tak jde zvládnou i to co se zdá nemožné.

Na konci si dovolím odcitovat Issaca Asimova: „Nejvzrušenější fráze, kterou lze ve vědě slyšet je ta, která ohlašuje nové objevy, a není to „Heureka!“, ale „To je legrační“.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Lektiny. Wikipedia [online]. 12. 6. 2022. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Lektiny>
- [2] ZIMOVÁ, Kamila. Vyhledávání nových potenciálních lektinů v houbách [online] Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/x338j/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [3] Lektin Proteini Özellikleri. In: www.ortaakarsu.net [online]. 3.10.2020. Dostupné z: <https://www.ortaakarsu.net/?p=6980>
- [4] ALÁN, Jan. Řešení 3D struktury proteinů na atomární rovní se zaměřením na lektiny a glykosyltransferasy [online]. Brno, 2007. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/ciico/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [5] Peter Hermann Stillmark [online]. 15.10. 2022. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Peter_Hermann_Stillmark
- [6] Peter Hermann Stillmark [online]. In: . EESTI AJALOOARHIIV [cit. 2022-11-27]. Dostupné z: <https://g.nh.ee/images/pix/1200x800/7dMb9MQ07Eo/ritsiini-avastaja-baltisaksa-biokeemik-peter-hermann-stillmark-83054861.jpg?up=1>
- [7] PALLARDY, Richard. What makes ricin toxic: A complicated history [online]. Earth.com, 2019. Dostupné z: <https://www.earth.com/news/ricin-toxic/>
- [8] MENCLOVÁ, Alena. Skočec obecný dokáže i zabít [online]. AbecedaZahrady.cz Dostupné z: <https://abecedazahrady.dama.cz/clanek/skocec-obecny-dokaze-i-zabit>
- [9] Skočec obecný [online]. In: . aquaraki.ru. Dostupné z: <https://tse2.mm.bing.net/th?id=OIP.2XKFWbBnq6AYGYGvvgF9EwAAAA&pid=Api&P=0>
- [10] BRŮNOVÁ, Lenka. \textit{Proteinové inženýrství lektinů – cílená mutageneze patogenních lektinů} [online]. Brno, 2008. Dostupné z: <https://theses.cz/id/xf0ex8/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [11] KAVKOVÁ, Eva. Vyhledávání nových sacharidy-vázajících proteinů v plísňích a houbách [online]. Brno, 2011 Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/m3sy2/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [12] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia*. 9. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007. ISBN 978-80-7182-213-4.

- [13] ČTVRTNÍČKOVÁ, Lenka. Lektiny [online]. Brno, 2009. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/fglz9/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Veronika SUCHODOLOVÁ.
- [14] Krevní skupiny. In: Červený kříž [online]. Dostupné z: <https://www.cckp9.cz/krevni-skupiny>
- [15] ŠTEFEK, Jiří. Jan Janský jako první objevil všechny krevní skupiny, Nobelovu cenu však získal někdo jiný. Reflex [online]. 8.9.2021. Dostupné z: <https://www.reflex.cz/clanek/historie/109121/jan-jansky-jako-prvni-objevil-vsechny-krevni-skupiny-nobelovu-cenu-vsak-ziskal-nekdo-jiny.html>
- [16] Jan Janský. In: Img.radio [online]. Dostupné z: https://img.radio.cz/n_jmJJ9TqdEwMtytPMeGYkAWOmE=/fit-in/280x280/1139918323_pictures/qs1/2006/jansky.jpg
- [17] SLIMÁKOVÁ, Margit. Dieta podle krevních skupin. PharmDr. Margit Slimáková [online]. 21.7.2015. Dostupné z: <https://www.margit.cz/podle-krevnich-skupin/>
- [18] Rozrazil lékařský. In: *Zahradnictvi-flos* [online]. Dostupné z: <https://www.zahradnictvi-flos.cz/veronica-officinalis-rozrazil-lekarsky.html>
- [19] KADLECOVÁ, Miloslava. Rozrazil lékařský. In: *Garten.cz* [online]. Dostupné z: <https://www.garten.cz/foto/cz/24186/>
- [20] Rozrazil rezekvítek. In: *Herbar.eu* [online]. [cit. 2023-01-07]. Dostupné z: <https://www.herbar.eu/rozrazil-rezekvitek>
- [21] HAMAŘAK, Martin. Rozrazil rezekvítek. In: *Zahrada-cs* [online]. 18.06.2015. Dostupné z: <https://www.zahrada-cs.com/foto/cz/53470/>
- [22] HOSKOVEC, Ladislav. CERCIS SILIQUASTRUM L.: zmarlika Jidášova / judášovec strukový. In: *Botany.cz* [online]. 6. 4. 2010. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/cercis-siliquastrum/>
- [23] Cercis siliquastrum - Judas Tree. In: *Jurassicplants* [online]. Dostupné z: <https://jurassicplants.co.uk/collections/spring-surprises/products/cercis-siliquastrum-judas-tree>
- [24] LE ROUX, Lou-Nita. Bauhinia tomentosa. In: *Sanbi* [online]. 5. 2005 [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: <http://pza.sanbi.org/bauhinia-tomentosa>
- [25] DE SANTO TOMÁS, Árbol. *Bauhinia tomentosa* [online]. In: .blogspot.com, 26.11. 2018. Dostupné z: <https://elarbolfmiamigo-encinarosa.blogspot.com/2018/11/bauhinia-tomentosa-arbol-de-santo-tomas.html>

- [26] Bauhinia Purpurea - Kachnar. In: *Mybageecha* [online]. Dostupné z: <https://mybageecha.com/products/bauhinia-purpurea-kachnar>
- [27] Orchidejový strom - Bauhinia purpurea. In: *Semena.cz* [online]. Dostupné z: <https://www.semena.cz/ostatni-exoticke-okrasne/679-orchidejovy-strom-bauhinia-purpurea-semena-orchidejoveho-stromu-4-ks.html>
- [28] BAČOVÁ, Iveta. *Studium vazebných vlastností lektinů pomocí aglutinace buněk* [online]. Brno, 2015 [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/znbud/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [29] JANČOVÁ, Karolína. *Charakterizace interakce vybraných lektinů s epitopy krevních buněk* [online]. Brno, 2020 [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/eummo/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Josef HOUSER a Michaela WIMMEROVÁ.
- [30] vlastní fotografie