

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**SEKUNDÁRNÍ METABOLITY ROSTLINNÝCH
KULTUR *IN VITRO* II**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, květen 2017

Alica Pakánová

Pod'akovanie:

Týmto by som rada poďakovala hlavne PharmDr. Marii Kašparovej, Ph.D. za jej pomoc, ochotu a odborné rady pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Takisto PharmDr. Janovi Martinovi, Ph.D. za pomoc pri analytickom spracovaní vzoriek metódou HPLC a tiež rodine a priateľom za podporu.

PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Akákoľvek literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

Alica Pakánová

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CIEĽ PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
3.1. Borievka virgínska	8
3.1.1. Popis rastliny	8
3.1.2. Využitie.....	9
3.1.3. Obsahové látky	9
3.2. Sekundárne metabolity rastlín.....	10
3.2.1. Význam a využitie rastlinných sekundárnych metabolitov	10
3.3. Podofylotoxín.....	11
3.3.1. Zdroje podofylotoxínu	11
3.3.2. Použitie a biologická aktivita.....	12
3.3.3. Mechanizmus účinku	13
3.3.4. Chemická štruktúra podofylotoxínu a jeho derivátov	14
3.3.5. Biosyntéza.....	16
3.4. Explantátové kultúry	17
3.4.1. Význam totipotencie	18
3.4.2. Typy explantátových kultúr.....	19
3.4.2.1. Kalusové kultúry	19
3.4.2.2. Suspenzné kultúry	22
3.4.3. Rastová krivka explantátovej kultúry	23
3.4.4. Pasážovanie rastlinnej kultúry	25
3.4.5. Potrebné priestorové a prístrojové vybavenie.....	26
3.4.6. Sterilizácia pomôcok a materiálu.....	26
3.4.7. Kultivačné médiá	27
3.4.7.1. Príprava kultivačného média	28
3.4.7.2. Zloženie kultivačného média.....	28
3.4.7.3. Rastové regulátory.....	31
3.4.8. Možnosti zvyšovania produkcie explantátových kultúr	32
3.4.8.1. Selekcia a screening	33
3.4.8.2. Optimalizácia fyzikálne-chemických podmienok	33

3.4.8.3.	Manipulácia s obsahom nutrientov v kultivačnom médiu.....	35
3.4.8.4.	Použitie prekursorov	35
3.4.8.5.	Biotransformácia	36
3.4.8.6.	Imobilizácia buniek	36
3.4.8.7.	Permeabilizácia	36
3.4.8.8.	Elicitácia	37
3.4.9.	Výhody a využitie explantátových kultúr	38
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	40
4.1.	Rastlinný materiál	40
4.2.	Prístroje a pomôcky	40
4.3.	Kultivačné nádoby a nástroje.....	40
4.4.	Kultivácia	41
4.4.1.	Zloženie a príprava použitého kultivačného média	41
4.4.2.	Pasážovanie kultúr	42
4.5.	Stanovenie podofylotoxínu	44
4.5.1.	Príprava vzorky.....	44
4.5.2.	Podmienky HPLC	44
4.5.3.	Použitie matematické vzorce pre výpočty	46
5.	VÝSLEDKY	47
5.1.	Tabuľky.....	47
5.2.	Grafy	49
6.	DISKUSIA	50
7.	ZÁVER.....	54
8.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	55
9.	ZOZNAM OBRÁZKOV	60
	ABSTRAKT	61
	ABSTRACT	62

1. ÚVOD

Rastlinné liečivá boli základom tradičnej medicíny tisícky rokov a v dnešnej dobe sú dopĺňané zložitými syntetickými zlúčeninami. V liečbe rakoviny, kde poznáme rôzne zložité cielené protinádorové terapie, však svoje uplatnenie stále nachádzajú látky získané z rastlín, či už priamo, alebo odvođením semi-syntézou. Záujem o ne stále stúpa. Takýmito účinnými látkami sú napríklad vinblastín, vinkristín, taxol, kamptotecín a aj podofylotoxín, ktorého sa týka aj táto diplomová práca. [1, 2]

Syntéza množstva látok prírodného pôvodu, a v tomto prípade aj podofylotoxínu, je však stále z dôvodu zložitej komplexnej a stereochemickej štruktúry náročná a ekonomicky nevýhodná. Ďalší problém predstavujú nízke koncentrácie žiadaných sekundárnych metabolitov, čo zvyšuje obtiažnosť ich izolácie. Podofylotoxín je lignan prirodzene sa vyskytujúci v rôznych množstvách v rodoch *Podophyllum*, *Juniperus*, *Linum*, *Thymus*, *Thuja* či *Teucrium*. Je získavaný hlavne extrakciou z koreňov a rizómov rastlín *Podophyllum hexandrum* a *Podophyllum peltatum*, ktoré obsahujú 4 % a 0,2 % podofylotoxínu. Dostupnosť podofylotoxínu je však limitovaná a ohrozená rozsiahlym zberom a náročnosťou pestovania *P. hexandrum*, čo spôsobilo zníženie jeho výskytu a zaradenie do zoznamu ohrozených druhov. [2, 3]

Z dôvodu, aby bol pri zvýšenom záujme o chemoterapiu z prírodných zdrojov zabezpečený dostatočný prísun žiadaných látok, je dôležité hľadať alternatívne zdroje sekundárnych metabolitov. Ako dobrá možnosť sa javí biotechnologická *in vitro* produkcia metabolitov rastlinnými bunkovými kultúrami a potenciálnym zdrojom je aj bunková kultúra odvođená z dreveniny *Juniperus virginiana*. Pre zabezpečenie maximálneho zvýšenia výťažkov je nutné optimalizovať podmienky a faktory s vysokým vplyvom na produkciu. To je možné ovplyvnením zloženia rastového média, fyzikálne-chemických podmienok alebo pridaním elicitorov a prekursorov. Takáto idealizácia podmienok je objektom množstva štúdií a s využitím ich záverov môže byť produkcia podofylotoxínu dostatočná pre pokrytie farmaceutických požiadaviek. [3]

2. CIEĽ PRÁCE

1. Zoznámiť sa s metodikou kultivácie rastlinných explantátových kultúr.
2. Sledovať v priebehu 15 pasáží produkciu podofylotoxínu kalusovej a suspenznej kultúry *Juniperus virginiana* (varieta 'Glauca').

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Borievka virgínska

Borievka virgínska (latinsky *Juniperus virginiana* L., česky jalovec virgínský, *Cupressaceae* - cyprusovité) sa prirodzene vyskytuje hlavne v Severnej Amerike, kde je táto drevina známa aj pod názvom Eastern Redcedar, nie je však náročná pre rast aj v iných oblastiach. Vo vhodných podmienkach dosahuje výšku 12-15 metrov a šírku 3-6 metrov. Rastie na priamom slnku alebo v čiastočnom tieni a vyhovuje jej rôzne zloženie pôdy. Tá môže byť aj ílovitá alebo piesočnatá. Výnimku tvoria trvalo prevlhčené alebo nadmerne zavlažované pôdy. Vysoká tolerancia slaných a alkalických pôd rastline umožňuje bezproblémový výskyt aj v prímorských oblastiach a rast na silnom slnku zabezpečuje čiastočnú ochranu pred škodcami. [4]

3.1.1. Popis rastliny

Koruna *Juniperus virginiana* je kužeľovitá. Na tenkých štvorhranných vetvičkách nesie špicaté ihlicovité 5-10 mm dlhé listy s jedným živicovým kanálkom a s dvoma bielymi prúžkami na vrchnej strane, alebo šupinovité 2 mm dlhé križmostojné listy, ktoré sú prišpicaté a na koncoch odstavajúce od vetvičky. Po rozomletí sú listy bez zápachu a sú zafarbené rôzne podľa kultivaru, napríklad žltkasté alebo modrozelené. *Juniperus virginiana* patrí medzi stále zelené dvojdomé dreviny. V samičích šišticiach sa vytvára jedno vajíčko v jednej šupine, tieto šupiny potom zdužinatia a vytvárajú nepravý plod, takzvaný galbulus. Ten pripomína modrú bobuľu vajcovitého tvaru s 1-3 trojhrannými bezkřídlymi semenami. U *Juniperus virginiana* tento plod dozrieva už v 1. až 2. roku. [4, 5, 6]



Obr. č. 1. *Juniperus virginiana* - list [7]

Juniperus virginiana sa vyskytuje v mnohých varietách, ktoré sa líšia veľkosťou, tvarom, zafarbením alebo inými charakteristikami. V tejto diplomovej práci bola použitá varieta 'Glauca'. *Juniperus virginiana* 'Glauca' dorastá do výšky približne 7 metrov a rozprestiera sa do šírky okolo 2 metrov. Jeho koruna má úzky stĺpcovitý až pyramidálny tvar a charakteristické je preňho modrasto-striebisté zafarbenie listov. [8]

3.1.2. Využitie

Vďaka hustému lístiu sa *J. virginiana* využíva ako prírodný vetrolam a často sa vysádza aj ako okrasná rastlina. Používa sa v drevospracujúcom priemysle, pričom sa využíva aj vedľajší produkt, ihlicovité listy s obsahom podofylotoxínu. Esenciálny olej, respektíve silica získavaná z jeho dreva a listov sa vďaka silnej aromatizácii a toxicite používa proti rôznym škodcom. [4, 9]

3.1.3. Obsahové látky

Jednou z hlavných obsahových látok *J. virginiana* je silica získavaná z dreva alebo listov. Kvantitatívnou analýzou jej zložiek bola dokázaná v zaznamenaných množstvách prítomnosť (-)- β -pinénu, safrolu, (-)-linaloolu, limonénu, myrcénu alebo (-)-bornylacetátu. Ich množstvá sa však líšili v rôznych varietách. [9]

Obsah silice v sušených listoch *J. virginiana* sa podľa štúdií pohybuje v rozmedzí 0,017-0,421 % suchej váhy. Obsah podofylotoxínu sa väčšinou pohybuje v rozmedzí 0,14-0,21 %, čo z neho robí vhodný alternatívny zdroj tejto látky. Destilácia silice z listov tento produkt nedegraduje, a preto je možné využitie duálnej extrakcie silice aj podofylotoxínu. [9]

V *J. virginiana* bola okrem podofylotoxínu (17,8 mg/g suchej váhy) dokázaná aj prítomnosť deoxypodofylotoxínu, a to v množstve 3,6 mg/g suchej váhy. V istej štúdiu [10] boli porovnávané výt'ažky z troch rôznych jedincov a z dvoch po sebe idúcich rokov, vo výsledkoch však boli množstvá podofylotoxínu aj deoxypodofylotoxínu približne ekvivalentné bez významných rozdielov.

3.2. Sekundárne metabolity rastlín

Rastliny sú jedinečným zdrojom niekoľko desiatok tisíc látok, ktoré nie je možné produkovať žiadnym iným organizmom. Sekundárne metabolity sú nebielkovinové látky, ktoré nemajú úlohu v základných metabolických procesoch, ako je napríklad fotosyntéza. Väčšinou vznikajú ako deriváty primárnych metabolitov, ako sú kyselina šikimová, mevalonová, aminokyseliny či acetylkoenzým A, alebo ich biogénna môže byť spojená s metabolizmom cukrov. Podľa cesty ich biosyntézy sa sekundárne metabolity delia napríklad na alkaloidy, polyfenoly, steroidy alebo terpenoidy. Mnohokrát sa podieľajú na rôznych procesoch. Nemusia tak byť len konečným produktom metabolizmu. Sekundárne metabolity sa vyskytujú v ktorýchkoľvek rastlinných častiach vo všetkých vyšších rastlinách, avšak v malých množstvách. Ich zastúpenie sa mení v závislosti na ontogenéze, podmienkach alebo časti rastliny, v ktorej sa nachádzajú. Môžu sa vyskytovať v aktívnej forme alebo vo forme, ktorá sa aktivuje po istom stimule. Produkciu sekundárnych metabolitov vyvolávajú látky nazývané elicitory. Tie môžu pochádzať napríklad z patogénov mykotického, bakteriálneho či kvasinkového pôvodu, alebo môžu byť abiotické, ako sú soli ťažkých kovov. Takéto látky sa často využívajú v *in vitro* produkcii sekundárnych metabolitov z dôvodu zvýšenia produkcie a urýchlenia doby získania žiadaného produktu. [5, 11, 14]

3.2.1. Význam a využitie rastlinných sekundárnych metabolitov

Význam prítomnosti sekundárnych metabolitov je v mnohých rastlinných druhoch otázný alebo nie úplne nevyhnutný. Väčšinou sa predpokladá ich úloha v obrane rastlinného organizmu pred istým druhom poškodenia alebo stresu, ako je napadnutie škodcom, patogénom alebo ochrana pred byľinožravcami, konkurujúcimi rastlinami, UV žiarením alebo osmoticky nevýhodným prostredím. Môžu sa prejavovať ako špecifické zafarbenie, chuť alebo vôňa daného rastlinného pletiva, v ktorom sa nachádzajú. Niektoré z nich majú úlohu v detoxifikačnom procese, v ktorom rastlina eliminuje splodiny metabolizmu, alebo majú uplatnenie ako signálne zlúčeniny, s využitím napríklad pri lákaní opeľovačov. Príkladom atraktantu aj obrannej látky sú antokyánové farbivá. Väčšinou sa v danom taxóne

vyskytuje jedna skupina chemicky podobných látok, ktorá je doplnená ďalšími zlúčeninami. [5, 12, 13, 14]

Dôležitosť sekundárnych metabolitov pre človeka nachádzame v oblasti agrikultúry (napríklad ako biopesticídy), potravinárstva (farbivá, arómy, príchute) a v neposlednom rade v použití ako rôzne účinné látky v oblasti medicíny a farmácie. Látky s rastlinným pôvodom sa tradične používajú už storočia. V dnešnej dobe tvoria liečivá odvodené z rastlinných metabolitov približne 25 % používaných farmaceutík. Ako príklad môžem uviesť napríklad morfin, digoxín, kamptotecín, kolchicín alebo kapsaicín. [1, 11, 14]

3.3. Podofylotoxín

Podofylotoxín je sekundárny metabolit patriaci medzi lignany. Základ štruktúry lignanov tvoria dve fenypropánové jednotky spojené dvoma centrálnymi β -uhlíkmi postranných reťazcov. Podofylotoxín patrí medzi aryltetralínové laktónové lignany a druhá skupina, arylnaftalénové lignany, sa tiež vyznačuje farmakologickými vlastnosťami a biologickou aktivitou. Tá je umožnená ich nepolárnym charakterom a jednoduchou priestupnosťou cez bunkové membrány. Lignany sa všeobecne vyznačujú antimikrobiálnou, antivírusovou a antimitotickou aktivitou a ich fyziologická funkcia v rastline spočíva v ochrane pred patogénmi. Ich prirodzený výskyt je charakteristický pre živicu, kôru a drevnaté časti stromu alebo semená. Hlavné využitie podofylotoxínu je ako prekurzor v chemickej syntéze protirakovinových látok etoposidu, teniposidu a etopofosu. V základnej štruktúre je totiž nevyužitelný z dôvodu jeho silnej toxicity. [15, 16, 17]

3.3.1. Zdroje podofylotoxínu

V súčasnosti sa za hlavný zdroj podofylotoxínu považuje *Podophyllum hexandrum* Royle (rastúci ako trvalá rastlina v lesoch Himalájí, a preto známy aj ako Himalayan maypple alebo *P. emodi*) so ziskom až 4 % podofylotoxínu. Účinná látka sa získava z jeho podzemných častí, konkrétne zo živice s názvom podofylín. Z dôvodu nízkej produkcie biomasy, dlhej juvenilnej fázy, obtiažnej regenerácie či

nedostatočného pestovania s náročnosťou na prirodzený habitat tejto rastliny, sa stretávame s potrebou hľadania nových zdrojov. [1, 3, 9]

Aj keď je podofylotoxín pomerne zriedkavý, nachádza sa aj v iných rastlinách patriacich do čeľadí *Podophyllaceae*, *Linaceae* alebo *Cupressaceae*. Ako dobrým alternatívnym zdrojom sa javí aj rod *Juniperus*. Koncentrácie v jednotlivých druhoch sa samozrejme líšia. Štúdie zamerané na porovnanie druhov *Juniperus* [16] určili koncentráciu podofylotoxínu v *Juniperus horizontalis* na 0,266-0,726 %, *Juniperus scopulorum* obsahoval od nedetekovateľných množstiev až po 0,118-0,401 % podofylotoxínu. Prítomnosť podofylotoxínu bola dokázaná aj v iných, ako sú napríklad *J. phoenicea*, *J. sabina* alebo *J. bermudiana*. [10, 16, 17]

Napriek tomu, že *Juniperus virginiana* obsahuje 0,1-0,34 % podofylotoxínu, čiže menej než *P. hexandrum* alebo ostatné druhy *Juniperus*, výhody jeho použitia sú založené na faktoch, že je to trvalá, vždyzelená rastlina s vysokou produkciou biomasy a výbornou ekologickou adaptabilitou. Navyše ihlice, miesto akumulácie podofylotoxínu, sú dobre dostupné ako vedľajší produkt v drevospracujúcom priemysle, ktorý využíva drevo *Juniperus virginiana*. V tom spočíva rozdiel v dostupnosti v porovnaní napríklad s *J. bermudiana*, ktorého výskyt je tiež ohrozený. [10, 16]

3.3.2. Použitie a biologická aktivita

Podofylín bol zahrnutý v americkom liekopise známom ako US Pharmacopoeia už v roku 1820 a táto živica sa používala v liečbe genitálnych bradavíc. Zloženie podofylínu tvorí α -peltatín, β -peltatín a podofylotoxín, ktorý tvorí až 50 %. Podofylín a podofylotoxín sa v Číne a Japonsku používali napríklad ako purgatívum, na liečbu hadích uštipnutí, rôznych kožných problémov alebo červami spôsobených infekcií gastrointestinálneho traktu. Ako purgatívum v dávkach 10-50 miligramov pôsobí mierne, vyššie dávky však môžu spôsobiť silné podráždenie až krvácanie. [1, 18, 19]

Podofylotoxín je látka s veľkým potenciálom. Jeho silná gastrointestinálna toxicita však neumožňuje jeho používanie v základnej štruktúre. To je možno výsledok jeho nerozpustnosti a nepredvídateľnej systémovej reakcie. Preto slúži ako prekursor na syntézu glukopyranozidových derivátov etoposidu a teniposidu,

ktoré sa vyznačujú lepšou rozpustnosťou a nižšou toxicitou než aglukony. Zároveň sa tým aj redukuje ich cytostatická aktivita. [3]

Indikáciami etoposidu v kombináčnej terapii sú testikulárne nádory, veľkobunkové a malobunkové karcinómy pľúc, rakovina žalúdka, vaječníkov či pankreasu. V liečbe lymfómov nachádza svoje uplatnenie menej často používaný teniposid. Používajú sa aj na liečbu určitých druhov leukémie, neuroblastómov a hepatómov a vykazujú tiež antivírusovú aktivitu. Proti karcinómu pľúc je schválené aj používanie etopofosu, čiže etoposid fosfátu, vo vode rozpustného derivátu etoposidu, ktorý je na etoposid konvertovaný v plazme po reakcii s fosfatázou. [2, 3, 15, 16]

Ďalšie deriváty podofylotoxínu vykazujú účinky v liečbe psoriázy, malárie a reumatoidnej artritídy. Takému derivátu etoposidu, označovanému ako CPH-82, boli v prvej a druhej fáze klinických štúdií počas troch mesiacov liečby pripísané významné pozitívne výsledky v znížení zápalového procesu, avšak spojené s už spomínanými gastrointestinálnymi ťažkosťami. [3, 16]

Podofylotoxín, deoxypodofylotoxín a β -peltatín vykazujú aj značnú antivírusovú aktivitu, napríklad proti vírom herpes simplex I alebo osýpkam. Podofylotoxínové prípravky nachádzajú svoje využitie aj v topickej liečbe genitálnych bradavíc a malígnych melanómov. Ukázalo sa tiež, že podofylotoxínové analógy majú imunosupresívnu vlastnosť, a tak sa javia ako nádejné v použití pri orgánových transplantáciách. Pri deoxypodofylotoxíne sa navyše ukázali antiproliferatívne, antiastmatické, antialergické, antiagregačné a insekticídne vlastnosti. [1, 2, 15, 20]

3.3.3. Mechanizmus účinku

Účinok podofylotoxínu má základ v jeho pôsobení ako antimitotický jed. Zastavuje bunkové delenie v metafáze bunkového cyklu väzbou na α/β -tubulínový dimér, čím sa inhibuje polymerizácia tubulínu, a teda tvorba mikrotubulov. To je príčinou narušenia tvorby deliaceho vretienka. [15, 21]

Na rozdiel od podofylotoxínu, etoposid a teniposid nepôsobia na úrovni mikrotubulov a deliaceho vretienka. Zastavujú bunkový cyklus v neskorej S fáze

alebo skorej G2 fáze a mechanizmus ich účinku je spojený s DNA topoizomerázou II, enzýmom, ktorý je schopný naviazať sa na oba reťazce DNA, rozštiepiť ich za účelom ich vzájomného prekladania a odstraňovania nadobrátok a uzlov, a následne ich spojiť. Etoposid sa viaže na štiepateľný komplex enzýmu a DNA a tým inhibuje túto funkciu topoizomerázy II. Rozštiepenému reťazcu DNA tak zabráňuje opätovne sa spojiť, a teda spôsobuje letálne poškodenie DNA vzniknuté na základe zlomov v dvojzávitnici DNA. [1, 3, 22]

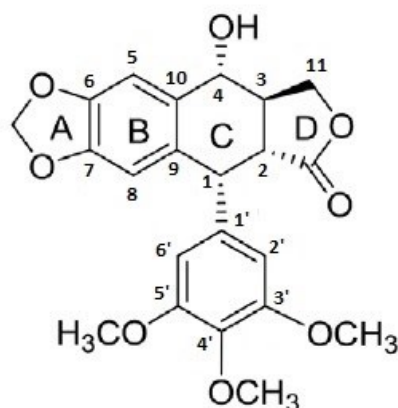
Pre syntetické analógy podofylotoxínu je charakteristická aj ďalšia vlastnosť. Ich schopnosť inhibovať reverznú transkriptázu im umožňuje bojovať proti RNA vírusom, akým je napríklad aj vírus HIV. [3]

3.3.4. Chemická štruktúra podofylotoxínu a jeho derivátov

Aryltetralínový lignan podofylotoxín je zložený z piatich kruhov označených ako A-E, z čoho kruhy A-D tvoria takmer planárny útvar a v jeho štruktúre hrajú významnú úlohu štyri chirálne centrá v polohách C1-C4. Tie spolu s trans- γ -laktónovým kruhom a *trans*- polohou kruhu E zapríčiňujú náročnosť jeho chemickej syntézy. [1, 23]

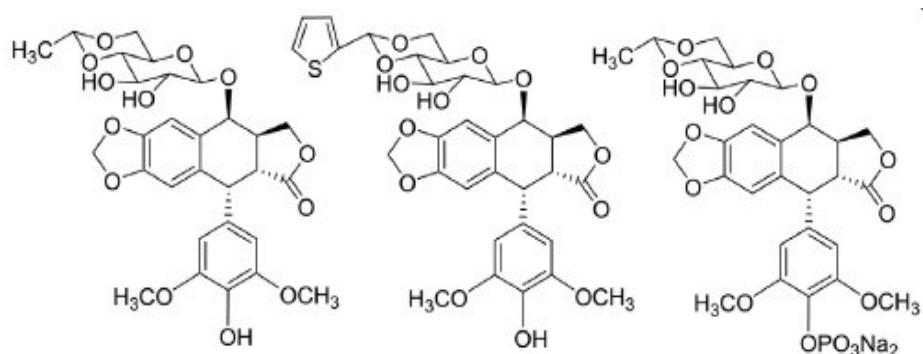
Dôležitá pre jeho funkciu, čiže väzbu na tubulín, je jeho OH- substitúcia na kruhu C. Pri epimerizácii alebo naviazaní väčších substituentov v tejto polohe, dochádza k zníženiu alebo vymiznutiu jeho schopnosti poškodzovať tvorbu mikrotubulov. To je práve odôvodnením, prečo látky etoposid a teniposid, ktoré sú glykozidickými zlúčeninami vzniknutými substitúciou práve v tejto polohe, už neovplyvňujú vznik deliaceho vretienka. [21]

Stratu aktivity však spôsobuje aj aromatizácia kruhu C a nevyhnutná pre jeho účinok je aj voľná rotácia kruhu E v α - konfigurácii. [23]



Obr. č. 2. Podofylotoxín [19]

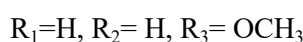
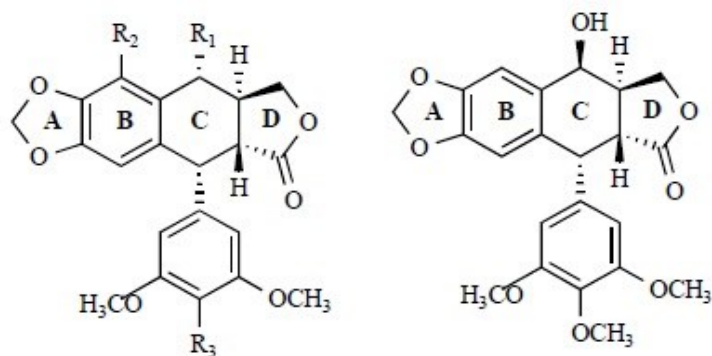
Etoposid, ktorého štruktúra bola syntetizovaná v roku 1966, a teniposid z roku 1967, pôsobia ako inhibítory topoizomerázy II. Dôležitá pre túto ich vlastnosť je demetylácia v polohe C-4' v kruhu E a epimerizácia v polohe C-4 v kruhu C, doplnená glykozidickým substituentom na tejto OH- skupine. [21, 23]



Obr. č. 3. Deriváty podofylotoxínu, zľava etoposid, teniposid a etopofos [19]

Rovnako ako inhibítory polymerizácie deliaceho vretienka pôsobia aj deriváty podofylotoxínu, ako sú deoxypodofylotoxín, ktorý je rovnako účinný ako podofylotoxín a C-4 stereoizomér epipodofylotoxín, ktorý je však menej aktívny o viac než rád. Pre antimitotický účinok týchto látok je nevyhnutná *trans*-konfigurácia laktónového cyklu a tiež R- konfigurácia na C-2 uhlíku. Ako príklad môžem uviesť pikropodofylotoxín, ktorý sa od podofylotoxínu líši práve

konfiguráciou na tomto uhlíku C-2, čo je príčinou zníženia jeho antimitotickej vlastnosti. [15]



Obr. č. 4. Deriváty podofylotoxínu, zľava deoxypodofylotoxín a epipodofylotoxín [2]

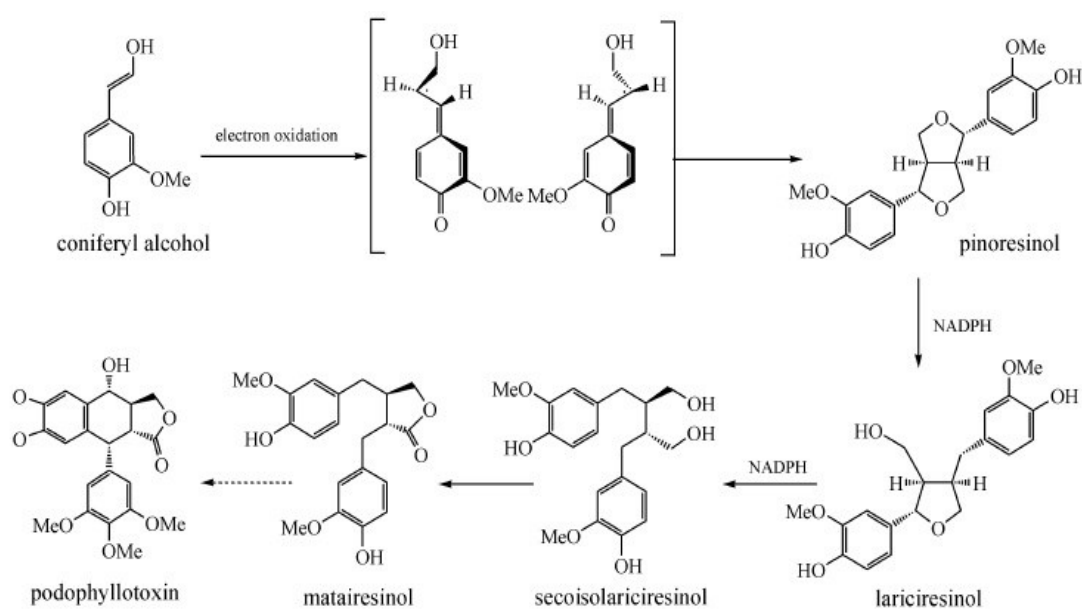
3.3.5. Biosyntéza

Biosyntéza podofylotoxínu nebola ešte úplne objasnená, predpokladá sa jeho vznik zlúčením dvoch molekúl koniferyl alkoholu vzniknutého deamináciou fenylyalanínu na kyselinu škoricovú a následne ďalšími krokmi. Spojením dvoch molekúl koniferyl alkoholu pomocou proteínového systému pinoresinol syntázy, tvoreného oxidázou a špecifickým proteínom zodpovedným za stereošpecifitu, sa vytvorí (+)-pinoresinol. Od ďalšieho kroku sa syntéza jednotlivých lignanov líši. Cesta k podofylotoxínu pokračuje redukciou (+)-pinoresinolu na (+)-lariciresinol a (-)-sekoisolariciresinol za účasti NADPH. Vznik ďalšieho medziproduktu, (-)-matairesinolu, sa uskutočňuje sekoisolariciresinol dehydrogenázou a nasledovný krok, konkrétne vznik deoxypodofylotoxínu, nie je zatiaľ úplne preštudovaný. Predpokladá sa jeho tvorba cez yatein a zahrňuje tvorbu kruhu A, hydroxyláciu a metyláciu kruhu E a uzatvorenie kruhu C. [1, 21, 23]

Experimentmi na bunkových suspenzných kultúrach *Podophyllum* a *Linum* bolo zistené, že deoxypodofylotoxín je prekurzorom podofylotoxínu aj 6-metoxypodofylotoxínu a ich glukozidov. Bunková kultúra *P. hexandrum* prekonvertovala dodaný deoxypodofylotoxín na podofylotoxín a jeho

β -D-glukozid, u kultúry *L. flavum* bol však rovnaký prekursor zmenený na 6-metoxypodofylotoxín. [1]

Podofylotoxín vzniká z deoxypodofylotoxínu hydroxyláciou v polohe 7 pomocou deoxypodofylotoxín-7-hydroxylázy, hydroxyláciou deoxypodofylotoxínu v polohe 6 zas vzniká β -peltatín. [1]



Obr. č. 5. Biosyntéza podofylotoxínu [23]

3.4. Explantátové kultúry

Dobrá možnosť pre produkciu sekundárnych metabolitov predstavujú rastlinné explantátové kultúry. Explantátové kultúry rastlín sa zakladajú izoláciou určitých častí rastlinného organizmu a následnou kultiváciou na kultivačnom médiu v aseptických podmienkach *in vitro*, pričom môže dochádzať k rastu, regenerácii a rôznym morfogenetickým procesom. Prvé pokusy s týmito kultúrami sa datujú už od roku 1902, kedy Haberlandt položil ich základy. Podstatnú časť úspešnej kultivácie tvorí ovplyvňovanie a kontrola kultivačných podmienok a kultivačného média a dôležité je aj zachovanie aseptických podmienok a dobrý fyziologický stav donorovej rastliny. Tá by mala byť nepoškodená a neinfikovaná patogénom. Tiež je známe, že výhodnejšie je použitie mladých pletív pred staršími. Mladé pletivá majú vyšší potenciál. [24, 27]

Po založení explantátovej kultúry a začatí kultivácie explantátu vo vhodných podmienkach sa môže vyskytnúť rôzna reakcia buniek na tieto nové podmienky a na fakt, že explantát už nie je pod vplyvom celistvej rastliny. Líšiť sa môže aj reagovanie explantátu na potenciálne poranenie vzniknuté pri izolácii. Explantáty, v závislosti na stupni prispôsobenia alebo poškodenia, tak môžu odumierať, ale aj prežívať a ďalej rásť bez akýchkoľvek zmien a regenerovať na celú rastlinu. Prosperovanie explantátovej kultúry je ovplyvnené aj obdobím odberu explantátu, orgánom, z ktorého pochádza, ontogenetickým alebo fyziologickým štádiom, alebo stavom či kvalitou donorovej rastliny. Explantátové kultúry sú ovplyvňované aj pomerom rastových regulátorov, auxínmi a cytokinínmi, ktoré môžu byť exogénne pridané do média. To sa vo výsledku prejavuje v raste a diferenciácii, organogenezou, alebo vo vývine kultúr na kalusy. [11, 12, 27]

3.4.1. Význam totipotencie

Každá somatická bunka v danej kultúre obsahuje kompletnú genetickú informáciu celej rastliny. Je teda schopná produkovať látky, ktoré sú typicky produkované intaktnou rastlinou, dokonca v niektorých prípadoch aj vo vyššom množstve. [14] Inak povedané, vďaka totipotencii je rastlinná somatická bunka schopná využiť úplnú genetickú informáciu, ktorú obsahuje, na regeneráciu, organogenezu a tvorbu odlišných buniek a vývin celistvého organizmu. [11]

Počas diferenciácie, kedy rastlinné bunky získavajú štruktúrnu a funkčnú špecializáciu a istú usporiadanosť do nadržaných celkov, sa genetická aktivita buniek znižuje, rovnako aj vlastnosť totipotencie. Výsledkom je fakt, že metabolizmus sekundárnych metabolitov v intaktnej rastline sa výrazne líši od toho v explantátových kultúrach. Tieto deje v rastline podliehajú zložitejšej regulácii a metabolity sú väčšinou tvorené len v určitých orgánoch a v istom období životného cyklu rastliny. Preto v istých prípadoch explantátová kultúra nemusí tvoriť žiadané metabolity, prípadne ich tvorí len v nízkej koncentrácii. K produkcii metabolitov nedochádza napríklad v prípade, keď je viazaná na konkrétnu anatomickú časť rastliny, ktorá v kalusovej alebo suspenznej kultúre nie je vytvorená, ako je to u mliečnic alebo sekrečných trichómov. Tiež musíme rátať s možnosťou, že

z dôvodu rôznych mutácií alebo blokácií génov, môže dôjsť k zastaveniu syntézy alebo akumulácie metabolitov. [11, 12, 25]

Explantát je väčšinou diferencovaná časť rastlinného organizmu. Diferenciáciou bunky však nedochádza k jej degenerácii a následnou kultiváciou za vhodných podmienok je možné vyvolať dediferenciáciu a návrat schopnosti vyjadrenia totipotencie, čím sa zároveň obnoví mitotické delenie. Následne je možný aj proces organogenézy alebo embryogenézy. To je založené na fakte, že diferencované bunky sa od buniek meristemických geneticky nelíšia. Táto schopnosť prechádzať z diferencovaného stavu opäť na bunky, ktoré sú schopné intenzívne sa deliť v meristemickom stave, výrazne odlišuje rastlinné bunky od živočíšnych. [11, 26, 36]

3.4.2. Typy explantátových kultúr

Explantátové kultúry môžu byť rozdeľované podľa viacerých hľadísk. Všeobecne ich môžeme deliť aj takto:

- Orgánové a meristémové kultúry sa využívajú v prípadoch, keď je produkcia látok viazaná na konkrétny orgán alebo špecializované pletivo, a teda vyžaduje určitý stupeň diferenciácie. Využívajú sa napríklad koreňové kultúry alebo meristémové kultúry obsahujúce aktívny meristém, čo sú väčšinou apikálne časti, z ktorých sa vyvíja výhon. Ako kultúry generatívnych orgánov sem patria kultúry peľnicové.
- Protoplastové kultúry sú získavané z rôznych pletív pôsobením enzýmov, ktoré degradujú bunkové steny.
- Kultúry embryí je možné získať zo zrelých semien, kultivovať *in vitro* a získať z nich celú rastlinu.
- Kalusové a suspenzné kultúry boli použité v tejto diplomovej práci. [27]

3.4.2.1. Kalusové kultúry

Pre tvorbu kalusovej kultúry *in vitro* sa používa primárny explantát tvorený diferencovanými bunkami rastlinných pletív alebo orgánov. Kalus, čiže zhluk buniek pletiva neorganizovaného, heterogénneho, nepravidelného a bez

usporiadania, sa tvorí dediferenciáciou a proliferáciou týchto pôvodne diferencovaných buniek, čím strácajú svoju funkčnú a morfológickú špecializáciu a dostávajú sa do istého juvenilného štádia. Kalusové pletivo môže byť teda tvorené rôzne diferencovanými bunkami. Od pôvodne diferencovaných až po novo dediferencované a s rôznou schopnosťou odpovedať na morfogénny signál. Kalusové kultúry sa získavajú z rôznych rozrezaných častí rastlín, pre ktoré je dôležité, aby boli sterilné. To znamená, že k tvorbe kalusu sú potrebné rezné plochy, ktoré sa kultivujú na médiu, v ktorom je dôležitá prítomnosť rôznych rastových regulátorov. Po izolácii diferencovaných buniek musí najprv dôjsť k dediferenciácii a až potom k mitotickému deleniu. Po izolovaní buniek z meristemického pletiva explantátu už k dediferenciácii nedochádza. Neskôr sa jednotlivé kalusové kultúry odvodené z jedného rastlinného organizmu môžu líšiť vzájomnou znášanlivosťou podmienok, potrebami prítomnosti rastových regulátorov, morfogénnym potenciálom alebo celkovou produkciou sekundárnych metabolitov, keďže štádium dediferenciácie a kalusového rastu je spojené s genetickou variabilitou a nižšou stabilitou. [11, 12, 24, 25, 28]

Po prenesení trvalých buniek explantátu získaného z intaktnej rastliny do vhodného kultivačného média sa bunky začínajú deliť po uplynutí istej adaptačnej fázy, ktorá závisí od miery diferenciácie buniek explantátu a tiež ich ontogenetického vývinu. Kalusové pletivo sa vyvíja v troch štádiách. Tými sú indukcia rastu, začiatok bunkového delenia (fáza proliferácie) a cytodiferenciácia. [26]

Počas rastovej indukcie dochádza k zmene vnútorného metabolizmu rastliny, hlavne čo sa týka syntézy DNA, RNA a proteínov. Kvôli prechodu diferencovaných buniek a pletív rôzneho typu na meristemické, a teda strate špecializácie v tejto fáze (trvajúcej 3-8 týždňov v závislosti na rastlinnom druhu, kultivačných podmienkach a médiu), musíme mnohobunkové kalusové pletivo považovať za nerovnorodé a tvorené bunkami a pletivami s rôznou schopnosťou spätnej diferenciácie. Všetky bunky s funkčným jadrom môžeme charakterizovať ako totipotentné, nie všetky sú však morfogeneticky kompetentné, pretože len niektoré bunky kalusu sú schopné odpovedať na morfogénny signál aktiváciou špecifických génov a regulačných mechanizmov, a teda ich rastom a diferenciáciou. [24, 26]

V proliferačnej fáze sa dediferencované bunky kalusovej kultúry delia, čím sa navyšuje bunková masa kalusu. Takto však na nové prostredie *in vitro* nereagujú všetky bunky. Bunky centrálnej zóny sa na rozdiel od buniek v povrchovej časti nedelia. Mitotickú aktivitu ovplyvňuje aj mnoho ďalších faktorov, ako sú dostupnosť živín, poranenie, anaerobné prostredie či vplyv svetla. [24, 26] Na začiatku vzniku kalusového pletiva sú prvé dva až tri mitotické cykly synchronizované, čo sa však mení so starnutím kultúry. Ďalej totiž v kaluse nad meristematickými deliacimi sa bunkami prevažuje parenchymatický typ buniek, pre ktoré je charakteristický nízky mitotický index a možný je aj výskyt buniek s vaskulárnymi a tracheálnymi elementmi, ktoré vznikajú procesom diferenciácie. [26]

V tejto poslednej fáze, počas cytodiferenciácie, bunky prechádzajú istou špecializáciou, ktorej výsledkom je morfológická heterogenita a rôzna morfogenetická kompetencia alebo tvarové vlastnosti. [24]

Následnou spätnou diferenciáciou a morfogenézou kalusu, ovplyvnenou hlavne vhodnou kombináciou rastových regulátorov, je možné pretváranie kalusu na regenerované štruktúry. To sa môže diať organogenézou spojenou s diferenciáciou apikálneho meristému koreňa a stonky. Dediferenciácia buniek a spätná diferenciácia väčšinou prebiehajú na rôznych živných médiách a môžu sa líšiť aj fyzikálne podmienky. [11, 27, 32] Proliferačnú kalusu podporuje rovnováha medzi koncentraciami auxínov a cytokinínov, to však neznamená, že ich koncentrácie sú rovnaké. Posun rovnováhy k vyššej koncentrácii cytokinínov oproti auxínom podporuje rast stonky a výhonkov. Pri koreňoch je naopak potrebná vyššia koncentrácia auxínov, keďže cytokiníny majú na tvorbu koreňov v proliferačnej fáze inhibičný vplyv. Celkový priebeh morfogenézy je inhibovaný kyselinou gibberelovou. Toto pôsobenie kyseliny gibberelovej však môže byť znižované prídavkom kyseliny abscisovej. Okrem rastových regulátorov môžu organogenézu spustiť aj rôzne fyzikálne či nutričné faktory, napríklad teplota, svetlo, prítomnosť sacharidov alebo dusíkatých látok. Ako však už bolo spomenuté, nie všetky bunky sú schopné takýto signál zachytiť. [12, 26, 27]

Organogenéza a regenerácia na celý rastlinný organizmus je možná aj po zmrazení kalusu pri teplote $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následnom rozmrazení, čoho výhoda spočíva

v zabránení endomitózy a vzniku polyploidie, k čomu nastáva pri dlhodobom pasážovaní. [27]

Vzhľad kalusov sa môže líšiť. Farebne rozlišujeme kalusy zelené, biele či žltkasté, prípadne červené, zafarbené antokyánmi vo vakuolách. Charakter ich textúry môže byť nodulárny, zrnitý, kompaktný alebo rozpadavý. Bunky sa líšia aj tvarom, môžu byť sférické alebo predĺžené. Tenkostenné s veľkou vakuolou sú bunky, ktoré sa nedelia. Bunky v štádiu aktívneho delenia majú naopak vakuolu malú. [28]

Kalusy sa vytvárajú v *in vivo* podmienkach ako rýchlo sa deliace hojivé pletivá na rane rastliny. Takéto kalusy sa však po čase prestávajú deliť a hynú z dôvodu vysokého množstva fenolických látok. [27]

Kalusové kultúry sa väčšinou používajú pre založenie bunkových suspenzných kultúr a následnú produkciu sekundárnych metabolitov. Tiež sú dobrým zdrojom pre tvorbu protoplastových kultúr. Na základe ich vlastností ako hojivé pletivá tiež poskytujú informácie o regeneračnej schopnosti pletív. Svoje uplatnenie nachádzajú aj v šľachtiteľstve nových odrôd, génovom inžinierstve a vegetatívnom množení rastlín. [11, 28]

3.4.2.2. Suspenzné kultúry

Bunkové suspenzné kultúry sú tvorené jednotlivými bunkami alebo malými zhlukmi buniek v tekutom kultivačnom médiu. Väčšinou sa zakladajú z rozpadavých kalusových kultúr tvorených dediferencovanými bunkami, ktoré sú premiestnené do tekutého média a v niektorých prípadoch môžu vznikáť aj obnovením bunkovej steny protoplastov. Kultivačné médium sa môže líšiť od média kalusových kultúr koncentráciou regulátorov a anorganických solí a je neustále premiešavané v špecializovaných trepačkách, čo spôsobuje mechanický rozpad kalusov a rôzne veľkých zhlukov buniek, keďže tieto bunky majú prirodzenú schopnosť vytvárať zhluky, retiazky a spájať sa. Preto je prakticky nemožné získať suspenziu tvorenú jednotlivými bunkami. Miešaním sa zabezpečuje aj rovnomerná distribúcia buniek, prevzdušňovanie, dobrá dostupnosť kyslíka a jednotlivých zložiek média. Kultivácia môže prebiehať v malých nádobách, ale aj vo veľkoobjemných fermentoroch, čo je prijateľné pre produkciu

veľkých množstiev metabolitov. Disperziu buniek v médiu ovplyvňuje vhodne zvolená vysoká koncentrácia auxínov a nižšia koncentrácia cytokinínov. Žiadaný je homogénny charakter kultúry, slabo diferencované a dostatočne separované bunky. [12, 24, 28]

U bunkových suspenzných kultúr je tiež možná regenerácia a organogenéza, a to po prenesení na spevnené kultivačné médium, kde sa vytvárajú meristematické noduly kalusového typu. Tieto rastové centrá, meristemoidy, môžu obsahovať tracheidálne bunky, ktoré zabezpečujú vaskularizáciu. K diferenciacii týchto meristemoidov môže dochádzať z jednotlivých buniek, častejšie sa to však deje z niekoľkých priestorovo alebo funkčne spojených buniek. Za indukciu organogenézy v suspenzných kultúrach sú väčšinou zodpovedné cytokiníny. [26, 32]

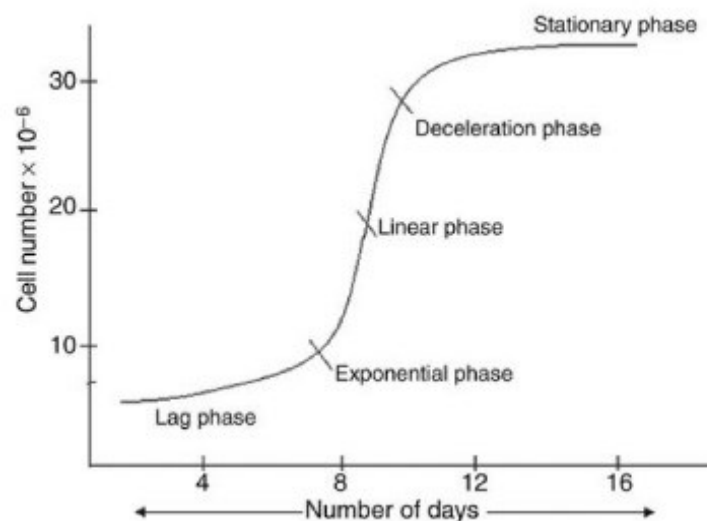
Aj u suspenzných kultúr musíme rátať s nestabilitou. Cytologicky sú možné ich zmeny s výslednými geneticky rozdielnymi líniami. Na odchýlky môžu vplývať počty bunkových delení, daný rastlinný druh, ale aj zloženie kultivačného média. Genetické zmeny tak stoja za vznikom heterogenity v kultúre [12, 36]

Využitie suspenzných kultúr je v produkcii sekundárnych metabolitov, v indukovaní genetickej a mutačnej manipulácie rastlinných buniek, v získavaní izolovaných buniek pre tvorbu protoplastov, na tvorbu rôznych bunkových línii a bunkových klonov, alebo ako materiál na indukciu alebo prípravu enzýmov. Suspenzné kultúry sú tiež vhodné pre uchovávanie procesom kryoprezervácie. [28, 36]

3.4.3. Rastová krivka explantátovej kultúry

Rastová krivka je grafické zobrazenie závislosti rastovej charakteristiky, napríklad počtu buniek kultúry alebo ich hmotnosti, na čase. Rozdeľuje sa na nasledovné fázy a ich doba trvania závisí od zloženia pôvodného kultivačného média aj média po prepasážovaní, tiež od fyzikálnych faktorov, typu buniek a ich veku. [36, 37]

1. Počiatková Lag-fáza: bunky sa postupne prispôbujú daným kultivačným podmienkam, do ktorých boli vnesené. Ich počet môže mierne klesnúť.
2. Exponenciálna fáza: intenzita mitotického delenia buniek je najvyššia, dochádza k exponenciálnemu rastu počtu buniek.
3. Lineárna fáza: dochádza k zníženiu intenzity delenia buniek, biomasa však stále lineárne narastá.
4. Fáza spomaleného rastu (deceleračná fáza): rýchlosť bunkového delenia sa znižuje na základe vyčerpania zdrojov výživy z média a začatými inhibičnými prejavmi. Táto inhibícia je spôsobená prítomnosťou škodlivých látok, ktoré vznikli metabolizmom, a zmenou pH, ktorú spôsobila zvýšená koncentrácia CO_2 .
5. Stacionárna fáza: počet buniek sa zachováva na rovnakej úrovni. Dochádza k tomu tým, že množstvo deliacich sa a odumierajúcich buniek je rovnaké. V tejto fáze zároveň dochádza k dosiahnutiu maximálnej populácie buniek. Tá závisí od množstva energetického zdroja, dusíka a kyslíka počas kultivácie.
6. Fáza úhynu buniek: odumieranie buniek prevyšuje vznik nových a ak by nedošlo k prepasážovaniu buniek na nové kultivačné médium, kultúra by uhynula. To je dôvod pasážovania, ktoré je najvýhodnejšie v intervaloch trvajúcich 3-4 týždne. [12, 24, 28, 37]



Obr. č. 6. Rastová krivka [28]

3.4.4. Pasážovanie rastlinnej kultúry

Kalus vzniknutý priamo na explantáte sa označuje ako primárny kalus. Jeho rozdelením na menšie časti, tzv. inokula, a prenesením na nové čerstvé kultivačné médium, je možné kultivovať ho neobmedzene dlho. Takéto prenášanie sa označuje ako pasážovanie alebo subkultivácia. Jedno obdobie medzi iniciáciou kultúry a jej prenosom na čerstvé médium sa nazýva pasáž alebo subkultivačný interval. Subkultivačné číslo vyjadruje koľkokrát došlo k prepasážovaniu od založenia primárnej kultúry. [37] Prepasážovanie primárneho kalusu je vhodné po zvýšení hustoty buniek kultúry a spotrebovaní väčšieho množstva nutrientov v médiu. Sústavným pasážovaním sa zabezpečuje údržba kultivovaného materiálu a jeho úspešný rast a prosperovanie. Jednotlivé kultúry sa môžu líšiť v potrebnej perióde prepasážovania a rozdielna je aj dĺžka kultivácie, ktorá je pasážovaním dosiahnutá. To môže závisieť od počtu buniek, ich hustoty a životaschopnosti, genotypových vlastností, rôznych technických problémov alebo regeneračného potenciálu kultúry, keď aj napriek pasážovaniu je u niektorých kultúr so slabou regeneračnou schopnosťou možné udržiavať ich len po kratší čas. [28]

Pasážovaním môže dochádzať k rôznej genetickej alebo epigenetickej variabilite, ku fenotypovým zmenám alebo rôznym morfogenetickým reakciám kultúr. V dlhodobom raste kalusovej kultúry a udržovanou dediferenciáciou môžu vznikať rôzne bunkové klony, ktoré sa vyznačujú rozdielnymi vlastnosťami, fenotypovou variabilitou, adaptabilitou a selektivitou. To sa môže prejavovať lepším postavením v kultúre, čo sa využíva pri výbere klonov s preferovanými vlastnosťami. Pasážovanie teda môžeme označiť za epigenetický zásah do genómu bunky, ktorý je však reverzibilný. [11, 28]

U suspenzných kultúr je výmena kultivačného média tiež dôležitá. Médium obsahuje limitované množstvo nutrientov, ktoré je počas intenzívneho delenia buniek pomaly vyčerpávané a pri ich nedostatku by sa prosperovanie kultúry zastavilo. Preto by k výmene média malo dôjsť pred týmto stavom, najlepšie vo fáze, kedy ešte dochádza k deleniu buniek, a zabezpečiť tak kontinuálny príjem živín. [36]

Explantátové kultúry odvodené z istých druhov, ku ktorým patria aj dreviny, môžu po poranení alebo po istom čase kultivácie podliehať hneďnutiu spôsobenému

enzýmami katecholoxidázou a polyfenoloxidázami. Dochádza k difúzii fenolických látok do kultivačného média a sú produkované ako reakcia na stres alebo poškodenie. Produkty polyfenoloxidáz pôsobia fytotoxicky, čo môže viesť k úhynu. Tomu sa dá zabrániť pridaním antioxidantov (kyseliny citrónovej alebo kyseliny askorbovej) alebo látok, ktoré adsorbujú fenolické zlúčeniny, ako sú napríklad aktívne uhlie alebo polyvinylpyrolidon. Uplatnenie nachádza aj skrátenie doby medzi pasážami alebo prepasážovanie nezasiahnutých častí kultúry do nového média. Pôsobenie enzýmov zodpovedných za hnednutie môže byť znížené aj inkubáciou explantátov v tme. [24, 26, 32]

3.4.5. Potrebné priestorové a prístrojové vybavenie

Laboratórium vhodné pre prácu s explantátovými kultúrami musí byť prispôbené na činnosti v aseptických podmienkach a tiež na prípravu, uchovávanie a sterilizáciu kultivačných médií a biologického materiálu. Potrebné sú kultivačné miestnosti s možnou reguláciou teploty a osvetlenia. Aseptická manipulácia s kultivačnými médiami a biologickým materiálom prebieha v laminárnom boxe alebo v prostredí so zabezpečeným laminárnym prúdením vzduchu. To je potrebné pre zakladanie *in vitro* kultúry a tiež jej pasážovanie do nového média. Prúdiaci vzduch je filtrovaný HEPA filtrami, ktorých póry zabraňujú prechodu patogénov. Špecifické prúdenie vzduchu bráni vzniku spätných prúdov, ktoré by vnášali patogény do nežiaduceho priestoru. Prostredie boxu alebo kultivačné miestnosti sú sterilizované germicídnymi žiaričmi s UV žiarením. Doba sterilizácie pred začiatkom práce je rôzna v závislosti na veľkosti priestoru. Pobyt človeka alebo prítomnosť kultúr v takomto žiarení je neprípustný. [11, 38]

3.4.6. Sterilizácia pomôcok a materiálu

Pre sterilizáciu pomôcok a používaného skla sú potrebné teplovzdušné sterilizátory, pomocou ktorých sterilizácia prebieha až 2 hodiny pri teplote 160 °C, alebo autoklávy, ktoré využívajú zvýšený tlak 100 kPa a teplotu 121 °C po dobu 15-30 minút, v závislosti na objeme. Nástroje sa sterilizujú zabalené, najčastejšie

v alobale. Rovnakou sterilizáciou pomocou autoklávu prechádzajú aj kultivačné médiá. Avšak tie termolabilné s obsahom proteínov, aminokyselín, gibberelínov alebo niektorých cukrov sa musia sterilizovať filtráciou pomocou membránových filtrov, prípadne je nutné sterilizovať tieto zložky zvlášť.

Na sterilizáciu rastlinného materiálu sa používa chemická sterilizácia sterilizačnými roztokmi, ako sú napríklad roztoky chloramínu, chlornanu sodného, chloridu ortuťnatého a ďalších, aj komerčne využívaných. Koncentrácia prípravku a dĺžka pôsobenia musí byť vhodne zvolená, aby sa predchádzalo poškodeniu biologického materiálu, ktorý je následne viacnásobne premytý sterilnou destilovanou vodou. [11, 12, 38]

3.4.7. Kultivačné médiá

Kultivačné médium s presne určeným zložením je jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich produkciu, rast, morfoγένezu, prosperovanie a dostatočnú výživu explantátovej kultúry. Izolované explantátové kultúry totiž nemôžeme prirovnať k intaktným rastlinám, ktoré sú plne autotrofné a schopné zabezpečiť si príjem potrebných látok. Kultúre tieto látky dokáže poskytnúť kultivačné médium charakterizované tiež optimálnym pH a osmotickými vlastnosťami. Jednotlivé explantátové kultúry z rôznych rastlinných druhov sa líšia v potrebe týchto látok. Niektorým stačia médiá so základným zdrojom uhlíka a anorganických nutrientov, iné môžu byť náročné na prítomnosť vitamínov alebo rastových regulátorov. Aby boli pokryté požiadavky širokého spektra rastlinných kultúr, bolo vyvinutých množstvo kultivačných médií s rôznym zložením, ktoré sa používajú všeobecne rozšírene alebo výhradne pre daný účel alebo pre úzke skupiny kultúr. Rozlišujeme pevné, polotekuté a tekuté médiá. Pomenované sú podľa vedcov, ktorí ich vytvorili. Ako príklad môžem uviesť niekoľko z nich. [24, 31]

Jedno z najrozšírenejších je Murashige a Skoog médium (MS) z roku 1962, ktoré bolo prvotne použité pre pletivá tabaku. Toto médium sa vyznačuje vysokými koncentraciami nitrátov, draslíka a amóniových iónov. Používa sa na podporu organogénzy a regenerácie a je využiteľné v kalusových, suspenzných aj orgánových kultúrach. Médium Gamborg, tiež označované ako B5 (1968) vyvinuté pre kalusovú kultúru sóje, obsahuje zvýšené množstvo nitrátov oproti amóniovým

katiómom. Je vhodné pre kalusové, suspenzné aj protoplastové kultúry. Ďalšími sú napríklad Schenk a Hildebrandt (SH, 1972), White (W, 1963), Nitsch a Nitsch (N, N 1969), Linsmaier a Skoog (LS, 1965). [28]

3.4.7.1. Príprava kultivačného média

Kvôli zníženiu počtu postupov, ku ktorým dochádza pri príprave média, a teda aby sa zabránilo možným chybám, sa používajú zásobné roztoky obsahujúce jednotlivé zložky. Tiež je ich používaním možné vyhýbať sa technicky nemožnému navažovaniu látok v mikrogramových množstvách. Navážené látky sa rozpúšťajú v príslušnom rozpúšťadle, prípadne sa tvoria kombinácie jednotlivých roztokov a následne dochádza k doplneniu na potrebný konečný objem. Zásobné roztoky anorganických solí alebo vitamínov sa pripravujú v koncentrácii 10-1000 krát vyššej než je konečná koncentrácia v živnom médiu po zriedení. Prakticky sa využívajú zásobné roztoky vitamínov, rastových regulátorov, mikroelementov a makroelementov, ktoré musia byť dostatočne zriedené pre zabránenie precipitácie jednotlivých iónov, ako sú napríklad sulfáty a fosfáty vápnika alebo horčíka. Takéto zásobné roztoky sa uchovávajú v chladničke v tmavých fľašiach. Ďalšie uľahčenie môže priniesť aj používanie koncentrovanej zmesi látok pripravenej špecializovanou firmou, ktoré sa rozpúšťajú vo vode na potrebnú koncentráciu. V kultivačnom médiu sa ďalej upravuje pH prídavkom HCl alebo NaOH a nevyhnutná je jeho sterilizácia. Pozornosť sa kladie aj na kvalitu vody, v ktorej sa rozpúšťajú zložky médií. Mala by byť čistá, deionizovaná alebo destilovaná. V žiadnom prípade by nemala byť z vodovodu. Zloženie média musí vyhovovať požiadavkám kultúry v jednotlivých etapách kultivácie. Pri založení kultúry sa často pridávajú antioxidanty, neskôr cytokiníny, ktoré sa podieľajú na tkanivovej proliferácii a nakoniec auxíny, ktoré podporujú diferenciáciu. [32, 36]

3.4.7.2. Zloženie kultivačného média

MAKROELEMENTY

Medzi makroelementy obsiahnuté v kultivačných médiách patria dusík, fosfor, vápnik, horčík, draslík a síra vo forme ich solí a oproti mikroelementom sú

vo vyššom množstve. Dusík a síra majú využitie pri syntéze proteínov, spolu s fosforom tiež pri syntéze nukleotidov. Fosfor v koncentrácii 1-3 mM je aj súčasťou koenzýmov NAD a NADP, fosfolipidov, bunkových membrán, a ako zložka ADP a ATP má dôležitosť v prenose energie. Syntézu bunkovej steny podporuje aj obsah vápnika. Horčík sa využíva ako enzýmový kofaktor alebo pri podpore membránovej integrity. Ióny draslíka sa podieľajú na osmotickej regulácii bunky a udržuujú pH. Dusíkaté zlúčeniny sa môžu okrem formy anorganických dusičnanových (v koncentrácii 25-40 mM) a amónnych (2-20 mM) iónov vyskytovať tiež ako organické látky, akými sú aminokyseliny alebo iné organické kyseliny. [11, 32]

MIKROELEMENTY

Mikroelementy sa vyznačujú ich malým množstvom v médiu, ich význam pre rast a prítomnosť je však nevyhnutná. Pri ich nedostatku môže dochádzať k spomaleniu rastu, chloróze listov alebo rôznej deformácii pletív. Medzi mikroelementy patrí železo, zinok, mangán, meď, bór, chlór, jód, molybdén alebo kobalt. Dostupnosť železa v kultúre zabezpečuje kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA), ktorá pôsobí na železo chelatačne a vytvára s ním komplexnú zlúčeninu. V tejto forme je dostupnosť železa možná v širokom rozmedzí pH. [11, 28]

UHLÍK

Významným zdrojom uhlíka v kultivačnom médiu pre mixotrofné až takmer heterotrofné rastlinné explantátové kultúry sú glukóza a hlavne sacharóza. Je možné použiť aj iné karbohydráty, ako sú napríklad maltóza či rafinóza, avšak s nižšou účinnosťou. Pridané cukry v médiu sú zdrojom energie, keďže pre mnoho rastlinných kultúr je proces fotosyntézy nemožný z dôvodu nedostatku chlorofylu, nedostatočného vyvinutia alebo nepatrnej výmeny plynov. Preto je ich množstvo v kultivačnom médiu v mnohých prípadoch jedným z najpodstatnejších vplyvov na produkciu sekundárnych metabolitov a rast buniek. Sacharóza sa tiež podieľa na zachovávaní osmotického potenciálu. Jej koncentrácia v médiu je väčšinou 2-3 %, avšak množstvá, ktoré sú priaznivé pre rast bunkovej kultúry naopak môžu pôsobiť inhibične na syntézu chlorofylu. Počas autoklávovania média je sacharóza hydrolyzovaná na glukózu a fruktózu, ktoré sú následne využívané pre rast.

Autoklávovaná fruktóza je však pre kultúru toxická, naopak autoklávovaná glukóza môže podporovať rast kalusu. [28, 31]

VITAMÍNY

Pre podporu optimálneho rastu, a hlavne dôležitosť v metabolických procesoch ako kofaktory enzýmových systémov, majú svoj význam v kultivačných médiách práve vitamíny. Bežne používanými vitamínmi sú tiamín (B1), kyselina nikotínová (B3), pyridoxín (B6), kyselina pantoténová (B5) a myoinositol. Ďalšie možné sú vitamín C, riboflavín (B2) alebo vitamín E. Jednotlivé médiá sa líšia obsahom týchto látok.

Tiamín, jeden z najvyužívanejších vitamínov, sa v médiách nachádza vo forme pyrofosfátu v koncentrácii 0,1-5,0 mg/l a jeho funkcia je ako kofaktor metabolizmu karbohydrátov a v biosyntéze aminokyselín. Jeho kombinácia s rastovým regulátorom typu cytokínínov môže ovplyvniť rast rastliny. Myoinositol má funkciu v príjme a využití iónov, v podporovaní rastu a tvorby bunkových stien a predpokladá sa jeho metabolizácia na pektín. Vitamín C ako významný antioxidant sa používa aj pri izolácii explantátov a na prevenciu oxidačného zhnednutia explantátov. Tiež indukuje bunkové delenie a predlžovanie a podporuje tvorbu výhonkov aj pri jej inhibícii spôsobenej kyselinou gibberelovou. Riboflavín inhibuje tvorbu kalusu, naopak však tiež podporuje rast výhonkov. [28]

AMINOKYSELINY

Aminokyseliny, ako zdroj dusíka v médiu, sú jednoduchšie prijateľné pre kultúru než dusík v anorganickej forme, aj keď ich prítomnosť v médiu nie je esenciálna, keďže bunky sú schopné ich syntetizovať aj v *in vitro* podmienkach. V kultivačných médiách sa využíva prídavok L-glutamínu, L-asparagínu, L-cysteínu alebo L-glycínu v rôznych zmesiach a ich prítomnosť ovplyvňuje rast protoplastových kultúr a somatickú embryogenézu. Prídavok jednotlivej aminokyseliny však môže pôsobiť na rast inhibične. [28]

OSTATNÉ ORGANICKÉ ZLOŽKY

Patria sem takzvané nedefinované zložky, ako sú kazeínový hydrolyzát, extrakt z kvasníc, kokosové mlieko alebo rôzne extrakty z pomarančov alebo rajčín.

Môžu pozitívne ovplyvňovať rast a regeneráciu, ale ich nevýhodou je neúplne definované zloženie, ktoré sa môže líšiť. [28]

Prídavok aktívneho uhlia a jeho adsorbčnej schopnosti sa využíva pri adsorbčii látok, ktoré môžu pôsobiť inhibične alebo môžu kultúru poškodzovať, ako sú napríklad oxidované fenolické látky, a teda pôsobí stimulačne. Pri adsorbčii rastových regulátorov má však inhibičný účinok. Zároveň spôsobuje stmavnutie média. [28, 36]

SPEVNŮJÚCE ZLOŽKY

Na prípravu semisolidných médií sa najčastejšie používa agar, vysokomolekulárny polysacharid získavaný z morských rias. Používa sa v koncentrácii 0,5-1 % a vyššie koncentrácie môžu spôsobovať ťažší prechod a difúziu nutrientov z média do tkanív. Jeho základnou vlastnosťou je jeho inertnosť. To znamená, že nereaguje s ostatnými zložkami v médiu a je odolný voči enzýmom. Ďalšie spevňujúce látky sú napríklad agaróza alebo fytigel. Ako mechanická podpora kultúry môže byť okrem gelifikujúcej látky použitý aj mostík z filtračného papiera, perforovaný celofán, špongie alebo iné pomôcky. [28]

3.4.7.3. Rastové regulátory

Ako rastové regulátory označujeme organické látky, ktoré sú pôvodnými rastlinnými hormónmi (fytormónmi), alebo ich syntetickými derivátmi. V kultivačných médiách môžu byť v rôznych množstvách, väčšinou vo veľmi nízkych koncentráciách, a ich funkciou je ovplyvňovanie rastu a iných fyziologických procesov. Medzi rastové regulátory a látky s rastovo-regulačnými účinkami patria auxíny, cytokiníny, gibberelíny, kyselina abscisová, etylén brassinosteroidy, kyselina jasmonová aj polyamíny. Môžu pôsobiť stimulačne alebo inhibične, avšak aj stimulátor vo vyššom množstve môže inhibovať. Ich vyváženým pomerom je možné regulovať jednotlivé rastové deje. Je však nutné myslieť na interakcie exogénne pridaných látok s tými endogénnymi. Po ich produkcii v jednej časti rastliny sú následne prenesené na miesto účinku, alebo môžu pôsobiť aj v mieste syntézy, čím sa líšia od živočíšnych hormónov. Líšia sa tiež tým, že jeden hormón môže regulovať viac fyziologických procesov. Cieľové bunky musia byť

prispôsobené na prijatie signálu špecializovanými receptorovými bielkovinami. Prítomnosť rastových regulátorov vedie k expresii génov, ktoré sú zodpovedné napríklad za transkripciu a následne ovplyvňujú rôzne vývojové štádiá. Odpoveď rastlinného explantátu na exogénne pridaný regulátor tak závisí na genotypе rastliny, fyziologickom stave explantátu a jeho veku. Lepšie odpovedajú mladšie pletivá a dôležitá je aj vhodná koncentrácia regulátoru. [11, 24, 32]

AUXÍNY

Auxíny podporujú bunkové delenie, predlžovací rast buniek, tvorbu kalusu a ovplyvňujú aj ďalšie fyziologické procesy ako sú geotropizmus, fototropizmus alebo apikálna dominancia. Tvorbu adventívnych koreňov podporujú v nižšej koncentrácii, vo vysokej koncentrácii dochádza k podporovaniu bunkového delenia a tvorby kalusu. Predpokladá sa, že v nadmerne vysokých koncentráciách môžu byť zodpovedné za chromozomálne a mitotické nepravidelnosti, a teda cytogenetickú nestabilitu. Tento efekt však závisí aj od ďalších kultivačných podmienok a ontogenetického vývoja kultúry. Patria sem napríklad kyselina 1-naftyloctová (NAA), kyselina indolyl-3-octová (IAA), indolyl-3-máselná (IBA) alebo kyselina fenylloctová (PAA). [11, 26, 33]

CYTOKINÍNY

Cytokiníny, ktorými sú napríklad kinetín, zeatín alebo BAP (6-benzylaminopurín), stimulujú delenie buniek. Vo vyššej koncentrácii inhibujú tvorbu koreňov a podporujú tvorbu výhonkov. Aj pomer auxínov ku cytokinínom ovplyvňuje morfogénu. Vyššie množstvo auxínov oproti cytokinínom podporuje iniciáciu tvorby koreňov a vyššie množstvo cytokinínov stimuluje proliferáciu axilárnych púčikov a výhonkov. U dvojkličnolistových rastlín väčšinou platí, že približne rovnaké koncentrácie podporujú tvorbu kalusu, u jednokličnolistových rastlín kalogénu indukuje vyššia koncentrácia auxínov. [28, 32]

3.4.8. Možnosti zvyšovania produkcie explantátových kultúr

Z dôvodu využívania uhlíka ako zdroja energie pre bunkové delenie v exponenciálnej fáze rastu, je väčšina sekundárnych metabolitov produkovaná vo fáze stacionárnej, keď sa potreba prísunu uhlíka pre primárny metabolizmus zníži.

Produkcia sekundárnych metabolitov explantátovými kultúrami je často nedostačujúca, nízka alebo variabilná. To môže byť práve výsledkom súperenia primárneho a sekundárneho metabolizmu o potrebné medziprodukty a nutrienty, alebo je to spôsobené nízkou expresiou potrebných génov. U niektorých kultúr dokonca vôbec nedochádza k produkcii látok, ktoré sú syntetizované v intaktnej rastline. Naopak, v niektorých kultúrach je produkcia látok vyššia. To môže byť výsledkom selekcie a screeningu veľkého počtu buniek s výberom tých najlepších. V neposlednom rade je významné zvyšovanie produkcie zabezpečené aj ovplyvňovaním kultivačných podmienok a kultivačného média. [30, 31]

3.4.8.1. Selekcia a screening

Pre indukciu explantátovej kultúry a získanie vysoko produktívnej bunkovej línie je základným a prvým krokom vhodný výber materskej rastliny s dostatočným obsahom žiadaných metabolitov. Môže sa použiť aj screeningová analýza veľkého počtu buniek alebo bunkových línií a následný výber najlepších. Vyselektovanie bunkových línií produkujúcich vysoké množstvá žiadaných látok môže byť zabezpečené aj metódami bunkového klonovania. Zníženie produkcie môže byť spôsobené aj genetickou nestabilitou a genetickými alebo epigenetickými zmenami spôsobenými mutáciami alebo zmenou podmienok. Preto musí byť pozornosť venovaná vhodným izolačným a selekčným metódam, ktorými je možné zabrániť takýmto zmenám v kultúre. Selekcia môže byť založená aj na princípe exponovania kultúry toxickým látkam alebo stresovým faktorom a následným výberom buniek so schopnosťou rezistencie k daným podmienkam. [14, 29, 30]

3.4.8.2. Optimalizácia fyzikálne-chemických podmienok

Faktormi, ktoré môžu ovplyvňovať produkciu, sú napríklad osmotický tlak, teplota, svetelné podmienky, pH prostredia, prevzdušňovanie, koncentrácia kyslíka a relatívna vlhkosť. Manipulovanie s týmito parametrami, spolu s ovplyvňovaním nutričného zloženia kultivačného média, tvorí základ optimalizácie. [29]

SVETLO

Vplyv svetla pôsobí hlavne na diferenciáciu buniek, organogénu, rast a morfológiu, ale aj na produkciu a akumuláciu metabolitov. Popisovaných je viacero faktorov, ako sú intenzita svetla od úplnej tmy až po 8000-10000 luxov, kvalita svetla alebo dĺžka osvetlenia. Najpoužívanejšie je studené biele svetlo. Jednotlivé kultúry sa líšia potrebou osvetlenia, od nepretržitého 24 hodín trvajúceho, až po dĺžku osvetlenia kratšiu ako 10 hodín. Fotoperiódou optimálnou pre väčšinu kultúr je 16-18 hodín a pri nedostatočnom alebo nadmernom osvetlení môže dochádzať k zníženej produkcii alebo poškodeniu kultúr. Pre rast zelených fotosyntetizujúcich kultúr je potrebná vyššia svetelná intenzita. [11, 31]

TEPLOTA

Pri zakladaní kultúry je vhodnejšia nižšia teplota, ktorá prispieva k zabraňovaniu šírenia infekcií. Všeobecne je však optimum pre väčšinu kultúr v rozsahu 20-25 °C. Pre každú kultúru by mala byť táto teplota vhodne zvolená. Teplota môže mať vplyv na zmenu vlastností molekúl rastových regulátorov, na expresiu génov, rýchlosť a senzitivitu enzymatických procesov, na morfológické alebo fyziologické procesy, akými sú dormancia či hydratácia. Ako príklad biotransformácie látok ovplyvnenej teplotou v bunkovej kultúre *Digitalis lanata* môžeme uviesť premenu digitoxínu na digoxín pri teplote 19 °C, avšak pri teplote 32 °C dochádza k tvorbe purpureaglykozidu A. [11, 14, 31]

VLHKOSŤ

Voda ako súčasť kultivačného média ovplyvňuje fyziológiu aj anatomickú štruktúru kultúr. Pôsobí na fungovanie prieduchov a ovplyvňuje vodný potenciál. Vhodná je nižšia relatívna vlhkosť, pri ktorej sa jednoduchšie prekonáva obdobie aklimatizácie. [11]

ACIDITA

Acidita živného média, ktorého optimálne hodnoty sú v rozmedzí 5,0-6,0, ovplyvňuje rast a vývin buniek, metabolizmus bielkovín, fungovanie regulátorov rastu a vitamínov a konzistenciu média. Príliš nízka alebo vysoká acidita môže rast buniek inhibovať a pH pod 5,0 zabraňuje tuhnutiu agaru. K zníženiu pH o 0,3-0,5 jednotiek dochádza počas sterilizácie autoklávom a k zmenám môže dochádzať aj

počas kultivácie. K zvyšovaniu napríklad pri príjme nitrátov, k znižovaniu pri asimilácii amoniaku. Pre zmeny acidity sa môžu používať aj prídavky kyseliny chlorovodíkovej alebo hydroxidu sodného. [11, 14, 28]

3.4.8.3. Manipulácia s obsahom nutrientov v kultivačnom médiu

Zloženie kultivačného média, ako jedného z najvplyvnejších kritérií ovplyvňujúcich rastlinnú produkciu, je objektom množstva štúdií.

Bolo dokázané, že pomer množstva amoniaku k dusičnanom, alebo celkové množstvo dusíka, má vplyv na produkciu sekundárnych metabolitov. Napríklad znížené množstvo amónnych katiónov a zvýšené množstvo dusičnanových aniónov podporuje produkciu šikonínu v kultúre *Lithospermum erythrorhizon* a celkovo nízke hladiny dusíka podporujú produkciu kapsaicínu v kultúre *Capsicum frutescens*. Amónne katióny sa tiež podieľajú na zmene pH v médiu. [14, 28]

Na produkciu a akumuláciu sekundárnych metabolitov má vplyv napríklad aj koncentrácia fosfátov. Nižšie množstvo fosfátov v médiu pôsobí na produkciu a hladiny kľúčových enzýmových systémov, čo sa prejavuje napríklad indukciou produkcie ajmalicínu v kultúre *Catharantus roseus*. Naopak vyššie množstvo fosfátov stimuluje syntézu digitoxínu v kultúre *Digitalis purpurea*. [14]

Minerálne zložky sa v médiu môžu rôzne synergicky alebo antagonisticky ovplyvňovať počas pôsobenia biotického alebo abiotického stresu na pletivá. To sa môže v konečnom dôsledku prejavovať ich nedostatkom alebo toxicitou s následným negatívnym vplyvom na kultúru. Vysoké množstvá fosforu, medi alebo zinku, ktoré pôsobia na kultúru a jej produkciu negatívne, môžu byť antagonizované vyššími množstvami železa, vápniku alebo horčíka. [28]

3.4.8.4. Použitie prekurzorov

Všeobecne v mnohých prípadoch platí, že exogénny prídavok východiskovej látky alebo medziproduktu istej biosyntetickej dráhy do kultivačného média navodí zvýšený výťažok žiadaných konečných produktov, sekundárnych metabolitov. Pre zabezpečenie správneho prekurzoru pre danú

kultúru je potrebná znalosť týchto biosyntetických dráh. Medzi najpoužívanejšie prekurzory patria napríklad fenylalanín, kyseliny šikimová, jasmonová, škoricová alebo mevalonová. Všeobecne prídavok aminokyselín ovplyvňuje produkciu mnohých alkaloidov, ako sú tropánové alebo indolové. [28]

3.4.8.5. Biotransformácia

Reakciami, ktoré sú umožnené prítomnosťou mnohých enzymatických systémov v explantátovej kultúre, môže z exogénne pridaných látok vznikajú mnoho žiadaných metabolitov na základe zmeny funkčných skupín v ich chemickej štruktúre. Výhoda použitia rastlinných kultúr spočíva v ich schopnosti meniť rôzne látky, nielen ich vlastné sekundárne metabolity. Sú tiež schopné katalyzovať stereošpecifické reakcie a vytvárať modifikácie, ktoré sú ťažko dosiahnuteľné aj chemickou syntézou. Žiadané metabolity vznikajú reakciami hydroxylačnými, oxidačno-redukčnými, acetylačnými, esterifikačnými, izomeračnými, metylačnými, glykozylačnými a mnohými ďalšími. [14, 30]

3.4.8.6. Imobilizácia buniek

Táto technika spočíva v zachytení buniek na vhodný nosič, akým môže byť napríklad alginát vápenatý, agar alebo polyuretánová pena. Bunky môžu byť tiež zadržané pomocou bariérových membrán a v niektorých technikách sa využíva aj imobilizácia enzýmov. Výhody vedúce k vyššej produkcii metabolitov spočívajú v zvýšení mechanickej stability buniek, a teda v znížení stresu, ktorému sú vystavené pri trení a pohyboch v suspenznej kultúre. Dochádza tiež k lepšiemu vzájomnému kontaktu a komunikácii medzi bunkami pomocou signálnych molekúl. V takejto kultúre tiež nie je podporovaný rast buniek, a teda prítomná je stacionárna fáza, kedy sa produkcia metabolitov zvyšuje. [28, 34]

3.4.8.7. Permeabilizácia

Bunky najčastejšie uskladňujú produkované sekundárne metabolity vo vakuolách a pri ich zvýšenej produkcii množstvo reálne získaných metabolitov

závisí na schopnosti bunky uvoľniť metabolity do média. Tieto látky môžu bunky uvoľňovať spontánne difúziou alebo aktívnym prenosom, avšak môžu byť podporené aj cieľenými metódami, ktoré zvyšujú výtťažok metabolitov, tzv. permeabilizáciou. Pri tom je však nutné použiť metódu, ktorá nenarúša životaschopnosť bunky. Takéto metódy využívajú rôzne látky ako napríklad dimetylsulfoxid alebo chitosan. Bunky môžu byť podrobené zmene pH, elektroporácii, ultrazvuku alebo prostrediu s extrémne vysokým tlakom, avšak len počas určitého krátkeho času. Prestup látok závisí aj na schopnosti tvorby pórov v membránovom systéme bunky. V suspenzných kultúrach sa na akumulácii metabolitov mimo intracelulárneho prostredia podieľa aj prítomnosť elicitorov. [30]

3.4.8.8. Elicitácia

Elicitory, ako látky biotického alebo abiotického pôvodu, sú signálom pre fyziologickú alebo morfológickú zmenu v rastline, a teda aj indukciu syntézy sekundárnych metabolitov. Sú to ióny kovov alebo iné anorganické zlúčeniny, ultrafialové žiarenie, látky z mikroorganizmov alebo aj látky produkované endogénne rastlinou proti alebo pri útoku nežiaduceho patogénu alebo bylinožravca. Konkrétne takými látkami sú napríklad chitosan, chitín, xantán, β -glukány alebo iné poly- alebo oligosacharidy či lipidové deriváty. Žiadané metabolity sú teda produkované ako obranná reakcia. Elicitor reaguje so špecifickým receptorovým proteínom v plazmatickej membráne a tým spúšťa signálnu dráhu, ktorá zapája rôzne iónové kanály, G-proteíny, protein kinázy a tzv. druhých poslov, čo vedie k naštartovaniu biosynthetickej dráhy vedúcej k produkcii a akumulácii sekundárnych metabolitov. Dochádza aj k expresii génov zodpovedných za kódovanie potrebných enzýmov. Prídavok elicitoru do rastlinnej kultúry okrem zvýšenia produkcie aj znižuje čas potrebný na získanie žiadaného množstva produktu. Je však nevyhnutné optimalizovať koncentráciu a dĺžku pôsobenia konkrétneho elicitoru pre danú kultúru. V bunkových kultúrach je možné často pozorovať aj synergistické pôsobenie viacerých elicitorov, hlavne ako kombinácia endogénneho a exogénneho elicitoru, prípadne pôsobenie dvoch exogénnych vplývajúcich na dva rôzne receptory. [3, 35]

3.4.9. Výhody a využitie explantátových kultúr

Výhod produkcie sekundárnych metabolitov s využitím explantátových kultúr je niekoľko:

- Významný je nulový vplyv geografických a klimatických podmienok na rastlinnú kultúru a dané kultivačné podmienky je možné regulovať. [14]
- Množstvo látok mnohokrát prevyšuje produkciu v intaktnej rastline a dokonca je možné získať zlúčeniny, ktoré sa v rastlinách normálne nevyskytujú. [14]
- Tento spôsob produkcie je časovo výhodný, keďže vývoj rastlín v podmienkach *in vitro* je rýchlejší. [12]
- Je možné získať metabolity pochádzajúce z rastlín, ktoré sú v prírode ohrozené, obmedzené, ťažko dostupné alebo v malých množstvách. [12]
- Pestovanie kultúr prebieha na omnoho menšej ploche ako v prírodných podmienkach, je teda možné dopestovať väčšie množstvo materiálu. [12]
- Získaná biomasa je sterilná a bez zvyškov látok ako sú herbicídy alebo insekticídy. [37]
- Kultivácia prebieha v podmienkach, v ktorých sa nenachádzajú negatívne biologické vplyvy, ako sú prítomnosť mikroorganizmov alebo hmyzu, a dopestovaný materiál je zdravý bez patogénov alebo vírusov, prípadne sa explantátová technika môže využiť na ozdravenie už napadnutého materiálu. V ozdravovaní sa často využívajú meristémové kultúry. [25]
- *In vitro* metódy prinášajú možnosti hybridizácie, genetickej manipulácie, bunkovej selekcie a získavania kultúr odolných voči rôznym extrémnym podmienkam, ťažkým kovom či herbicídom, alebo produkujúcich vyššie množstvo žiadaných metabolitov. Metódy fúzie protoplastov alebo iné *in vitro* postupy prinášajú možnosti získania nových genotypov. [12, 24]
- Technika mikropropagácie umožňuje vegetatívne množenie rastlín a tým tvorbu geneticky identických klonov. [36]
- Explantátové kultúry nachádzajú význam aj v genetickom inžinierstve pri tvorení genobaniek meristémov alebo ďalších častí obsahujúcich istú genetickú informáciu. Pri zmrazovaní týchto genobaniek až na teplotu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocou tekutého dusíka dochádza k zastaveniu metabolických procesov a k uchovávaní rastliny a jej genofondu aj v priebehu niekoľkých rokov. [12, 24]

- Použitie explantátových kultúr v biotechnológii rastlín všeobecne umožňuje cieľavedomú reguláciu rastu a produkcie, čo vedie k ochrane rastlín a získavaniu biomasy a látok využiteľných vo farmácii, potravinárstve, šľachtiteľstve rastlín aj agropriemysle. V priemysle sú kultúry udržiavané vo fermentoroch. To sú valce väčších objemov naplnené kultivačným médiom a suspenznou kultúrou buniek s prístupom sterilného vzduchu a poskytnutými vhodnými podmienkami pre kultúru. Rôzne bioreaktory je však nutné vhodne navrhnuť pre použitie prispôbené náročným podmienkam buniek a vyhnúť sa tak smykovému napätiu a silám, čo ich môže poškodzovať. [3, 24, 25]

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Rastlinný materiál

V diplomovej práci bola použitá kalusová kultúra *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca', ktorá bola odvodená z povrchovo vysterilizovaných listov vo februári 2012. Pozorovaná bola produkcia podofylotoxínu tejto kultúry v priebehu 15 pasáží, od 32. pasáže (čiže ako trojročná kultúra) do 46. pasáže (štvorročná kultúra).

Suspenzná kultúra *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca' bola odvodená od trojročnej kultúry v 32. pasáži. V diplomovej práci bola sledovaná produkcia podofylotoxínu opäť v priebehu 15 pasáží, a to od 5. pasáže (3 mesiace stará kultúra) do 19. pasáže (jednoročná kultúra).

4.2. Prístroje a pomôcky

Pri experimentoch boli použité nasledujúce prístroje:

Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen

Autokláv PS 20A, Chirana, Brno

Teplovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno

Box s laminárnym prúdením Fatran LF, Žilina

Trepačka VKS 75A, Edmund Buehler GmbH, Hechingen

Ultrazvuková lázeň RK 100H, Bandelin electronic GmbH, Berlín

Centrifúga MPW 342, Mechanika precyzyjna, Varšava

Chromatografická zostava JASCO 2000-Plus, Jasco, Tokyo

4.3. Kultivačné nádoby a nástroje

Experimenty s explantátovými kultúrami prebiehali s použitím skla SIAL, ktoré je odolné voči chemikáliám a vysokým teplotám. Kovové nástroje, ktoré boli použité pri práci s rastlinným materiálom boli opláchnuté 96% etanolom a zabalené v hliníkovej fólii. Takto boli následne sterilizované teplovzdušným sterilizátorom 2 hodiny pri teplote 200 °C.

4.4. Kultivácia

4.4.1. Zloženie a príprava použitého kultivačného média

Pre kultiváciu explantátových kultúr *Juniperus virginiana* sa použilo kultivačné médium podľa Schenka a Hildebrandta (SH médium). Zloženie tohto média je nasledovné [43]:

KNO ₃	2 500,00 mg.l ⁻¹
CaCl ₂	151,00 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	195,00 mg.l ⁻¹
(NH ₄)H ₂ PO ₄	300,00 mg.l ⁻¹
KI	1,00 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	5,00 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ H ₂ O	10,00 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,00 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,10 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,20 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,10 mg.l ⁻¹
NaFeEDTA	19,80 mg.l ⁻¹
kyselina nikotínová	5,00 mg.l ⁻¹
pyridoxín chlorid	0,50 mg.l ⁻¹
tiamín chlorid	5,00 mg.l ⁻¹
myoinositol	1000,00 mg.l ⁻¹
sacharóza	30 000,00 mg.l ⁻¹

K takto zloženému médiu boli pridané ešte nasledovné látky:

kyselina α -naftyloctová	3,0 mg.l ⁻¹
kinetín	0,2 mg.l ⁻¹
kyselina askorbová	15,0 mg.l ⁻¹

Látky potrebné pre zloženie kultivačného média boli navážené na analytických váhach alebo odpipetované zo zásobných roztokov. Živné médium s dobre rozpustenými a zmiešanými zložkami sa doplnilo na objem 1 liter destilovanou vodou. Takto pripravené médium sa pomocou odmerného valca rozlievalo po 30 ml do 100ml Erlenmeyerových baniek. Pre kultiváciu kalusových kultúr boli do baniek pred rozlievaním vložené mostíky z filtračného papiera. Následne sa banky uzatvorené hliníkovou fóliou sterilizovali v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C a tlaku pary 0,1 MPa.

4.4.2. Pasážovanie kultúr

Kalusové kultúry boli pasážované v boxe s laminárnym prúdením, ktorý bol pred pasážovaním sterilizovaný germicídnym žiarením. Na pasážovanie kultúr boli použité sterilizované pinzety, ktoré boli pred použitím balené v hliníkovej fólii. Nimi boli vhodné časti kalusov prenášané na papierové mostíky a čerstvé médium v tiež sterilizovaných Erlenmeyerových bankách. Následne hliníkovou fóliou uzatvorené banky boli uložené v kultivačnej miestnosti s teplotou 25 °C a svetelnou periódou 16 hodín svetla a 8 hodín tmy.

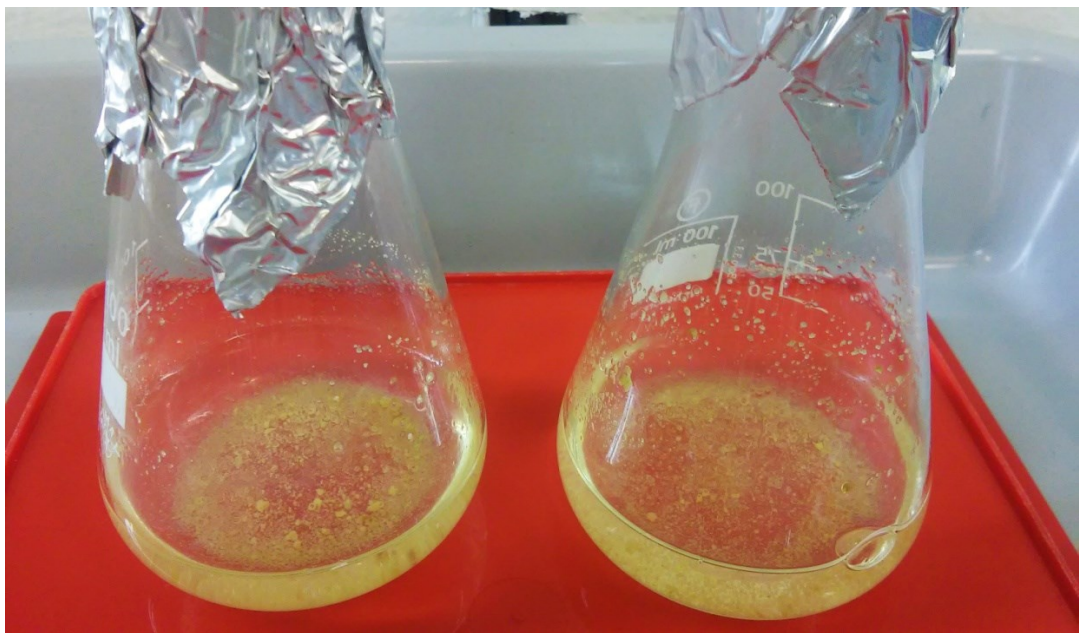
Kalusová kultúra *Juniperus virginiana* bola pasážovaná v 28dňových subkultivačných intervaloch. Po každých 28 dňoch kultivácie bola odobraná vzorka kultúry, ktorá bola následne vysušená pri laboratórnej teplote a analyzovaná na obsah podofylotoxínu. Iná časť kultúry bola prepasážovaná a kultivovaná pri rovnakých podmienkach ďalších 28 dní.

Pasážovanie suspenznej kultúry bolo uskutočňované v sterilnom boxe prenášaním 2 ml suspenzie do čerstvého média. Erlenmeyerove banky uzatvorené hliníkovou fóliou sa následne umiestnili na trepačku v kultivačnej miestnosti s rovnakými podmienkami.

Suspenzná kultúra *Juniperus virginiana* bola odobraná zfiltrovaním za zníženého tlaku na Büchnerovej nálevke a usušená pri laboratórnej teplote. Subkultivačný interval bol 21 dní. V obidvoch prípadoch bolo sledovaných 15 pasáží.



Obr. č. 7. Kalusová kultúra *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca'



Obr. č. 8. Suspenzná kultúra *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca'



Obr. č. 9. Kultivácia suspenzných kultúr na trepačke

4.5. Stanovenie podofylotoxínu

4.5.1. Príprava vzorky

Bolo odvážených 0,3000–0,5000 g usušenej práškovanej kultúry *Juniperus virginiana*. Navážené vzorky sa zmiešali v 10,0ml odmernej banke s 10,0 ml metanolu a extrahovali sa 1 hodinu v ultrazvuku pri laboratórnej teplote. Extrakty boli prevedené do centrifugačných skúmaviek a odstredované po dobu 5 minút pri 4500 otáčkach. Supernatanty boli prevedené do vialiek a následne analyzované metódou HPLC-DAD.

Pre kvantifikovanie obsahu meraných látok bola použitá matematická metóda normalizácie a porovnanie s kalibračnou krivkou, ktorá bola vytvorená pomocou externe meraného štandardu rovnakej látky.

4.5.2. Podmienky HPLC

HPLC podmienky boli nasledovné: hlavná vlnová dĺžka bola nastavená na 280 nm a referenčné vlnové dĺžky pre lepšiu identifikáciu píku boli nastavené na

270 a 290 nm. Použitá bola RP-18 Lichrospher kolóna (250 x 4 mm, veľkosť častíc 5 μm) a ochranná predkolóna z rovnakého materiálu.

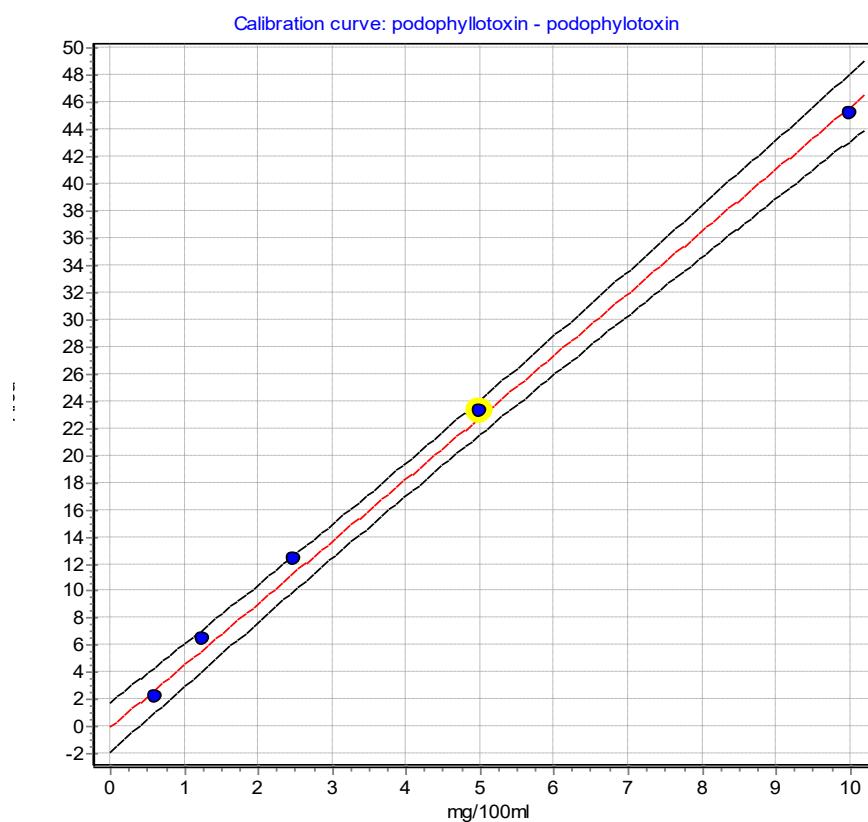
Vstrekované objemy roztokov vzoriek a štandardov boli 20 μl a kolóna sa vyvíjala pri 25 $^{\circ}\text{C}$.

Mobilná fáza obsahovala zložky (A) metanol/voda/kyselina fosforečná (60:39,7:0,3; v/v/v) a (B) metanol/kyselina fosforečná (99,7:0,3; v/v).

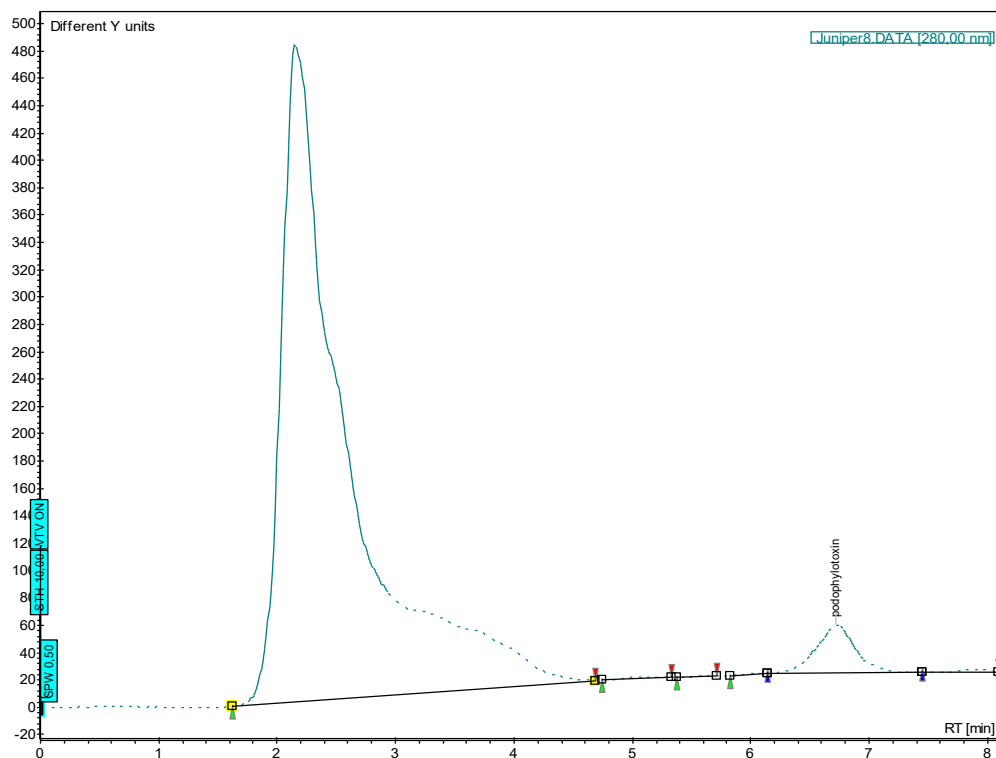
Elučný gradient bol navrhnutý nasledovne: 0–8 min, 0–80 %; 8–9 min, 80–100 %; 9–10 min, 100 %; 10–11 min, 100 % – 0 %; 11–13 min, 0 % rozpúšťadla B.

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola 1 ml/min.

Pre stanovenie podofylotoxínu bola vytvorená kalibračná krivka.



Obr. č. 10. Kalibračná krivka podofylotoxínu



Obr. č. 11. Príklad chromatografického záznamu

4.5.3. Použité matematické vzorce pre výpočty

Pri spracovaní získaných hodnôt boli použité vzorce na určenie aritmetického priemeru a smerodajnej odchýlky.

Aritmetický priemer

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

\bar{x} = aritmetický priemer, n = celkový počet hodnôt, x_i = namerané hodnoty

Smerodajná odchýlka

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

s = smerodajná odchýlka, n = celkový počet hodnôt, x_i = namerané hodnoty

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabuľky

Tab. č. 1. Obsah podofylotoxínu v kalusovej kultúre *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca'

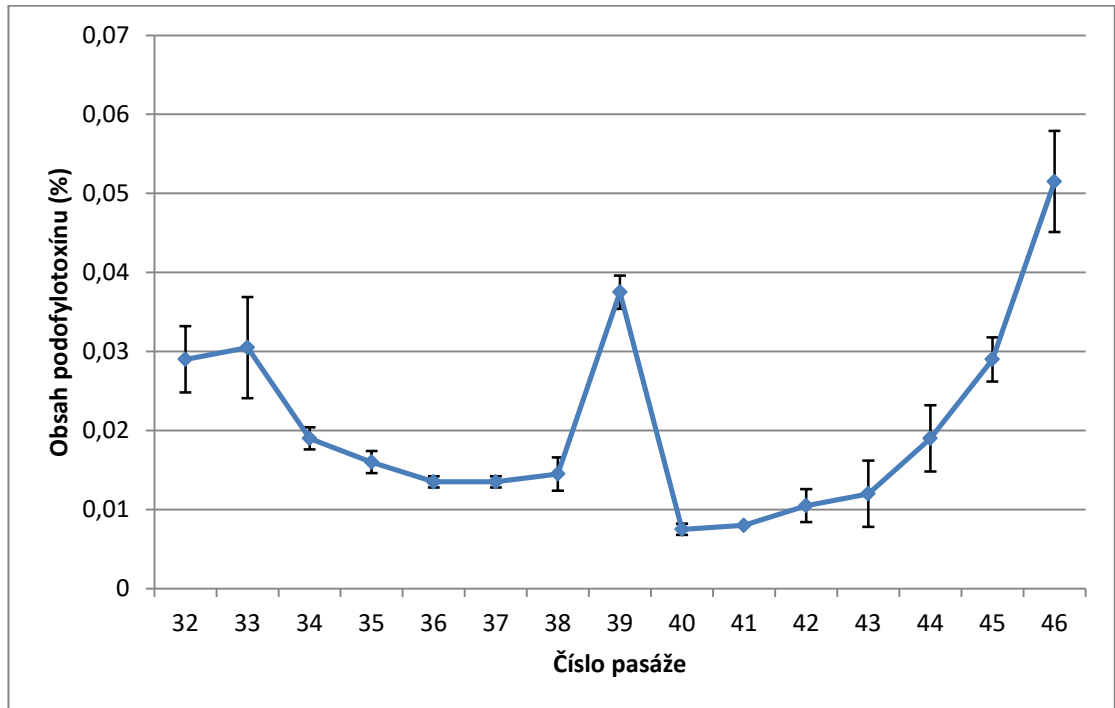
Číslo pasáže	Obsah podofylotoxínu (%)	Priemerný obsah podofylotoxínu (%)
32.	0,032 0,026	0,029 ± 0,0042
33.	0,026 0,035	0,0305 ± 0,0064
34.	0,018 0,020	0,019 ± 0,0014
35.	0,015 0,017	0,016 ± 0,0014
36.	0,013 0,014	0,0135 ± 0,0007
37.	0,014 0,013	0,0135 ± 0,0007
38.	0,016 0,013	0,0145 ± 0,0021
39.	0,039 0,036	0,0375 ± 0,0021
40.	0,007 0,008	0,0075 ± 0,0007
41.	0,008 0,008	0,008 ± 0,0000
42.	0,009 0,012	0,0105 ± 0,0021
43.	0,009 0,015	0,012 ± 0,0042
44.	0,016 0,022	0,019 ± 0,0042
45.	0,031 0,027	0,029 ± 0,0028
46.	0,047 0,056	0,0515 ± 0,0064

Tab. č. 2. Obsah podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca'

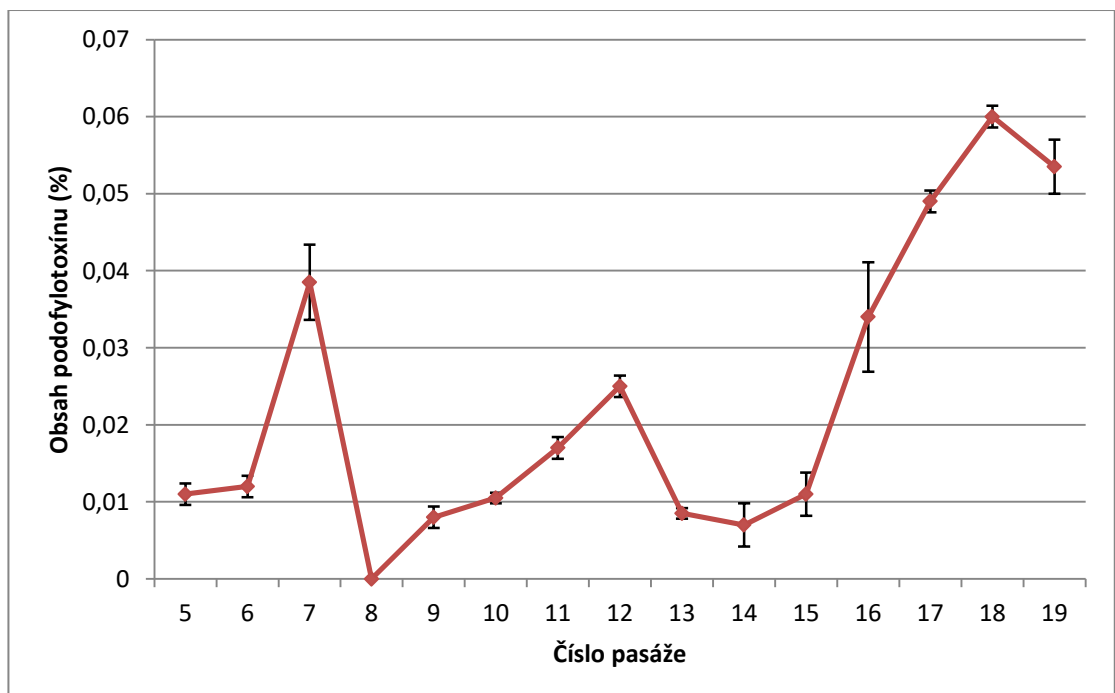
Číslo pasáže	Obsah podofylotoxínu (%)	Priemerný obsah podofylotoxínu (%)
5.	0,010 0,012	0,011 ± 0,0014
6.	0,013 0,011	0,012 ± 0,0014
7.	0,042 0,035	0,0385 ± 0,0049
8.	0,000 0,000	0,000 ± 0,0000
9.	0,009 0,007	0,008 ± 0,0014
10.	0,011 0,010	0,0105 ± 0,0007
11.	0,018 0,016	0,017 ± 0,0014
12.	0,024 0,026	0,025 ± 0,0014
13.	0,009 0,008	0,0085 ± 0,0007
14.	0,005 0,009	0,007 ± 0,0028
15.	0,013 0,009	0,011 ± 0,0028
16.	0,029 0,039	0,034 ± 0,0071
17.	0,048 0,050	0,049 ± 0,0014
18.	0,061 0,059	0,060 ± 0,0014
19.	0,051 0,056	0,0535 ± 0,0035

5.2. Grafy

Graf č. 1. Obsah podofylotoxínu v kalusovej kultúre *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca' v závislosti na počte pasáží



Graf č. 2. Obsah podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana*, varieta 'Glauca' v závislosti na počte pasáží



6. DISKUSIA

Lignan podofylotoxín, látka prírodného pôvodu, ktorá je známa a významná svojimi protirakovinovými vlastnosťami a potenciálom, sa v dnešnej dobe využíva ako prekurzor v syntéze liečivých látok etoposidu, teniposidu a etopofosu. Maximálna produkcia je dosiahnutá v jednotlivých druhoch *Podophyllum*. Pre jeho získavanie je však z rôznych príčin vhodný aj rod *Juniperus*. Dostupnosť podofylotoxínu v prírode je však veľmi nízka a obtiažna, jeho syntéza ekonomicky nevýhodná, a preto je nevyhnutné hľadať jeho alternatívne zdroje, ktorých príkladom je aj využitie produkcie explantátovými kultúrami. Nasledovne je možné a vhodné kultiváciu ovplyvňovať, pozorovať a prinášať výsledky zvýšenej produkcie, napríklad použitím vhodného živného média, fyzikálnych podmienok alebo vhodných fytohormónov. [3, 44]

Podľa publikovaných výsledkov v práci, ktorá hodnotila kultiváciu kultúr *Juniperus chinensis* [39] a v štúdiu priamo s kultúrami *Juniperus virginiana* [44], aj pri kultivácii v tejto diplomovej práci použitých kalusových a suspenzných kultúr *Juniperus virginiana* 'Glauca' bolo zvolené médium podľa Schenka a Hildebrandta s prídavkom $3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ kyseliny α -naftyloctovej a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetínu. Prídavok $15,0 \text{ mg.l}^{-1}$ kyseliny askorbovej zabraňuje hnednutiu kultúr.

Pri sledovaní rastu explantátovej kultúry *Juniperus virginiana* [44] bola vo všetkých sledovaných varietách ('Hetzii', 'Glauca', 'Grey Owl') maximálna biomasa kalusových kultúr zaznamenaná na 35. deň kultivácie, kedy exponenciálna fáza rastu dosahovala maximum. Preto je doporučovaný subkultivačný interval maximálne 35 dní. Suspenzné kultúry odvodené z dvojročných kalusových kultúr vykazovali maximálnu biomasu na 21. deň kultivácie, a preto je subkultivačný interval 21 dní. To odpovedá faktu, že rast suspenznej kultúry je v porovnaní s kalusovou rýchlejší, čoho príčinou môže byť lepší prístup nutričov a prevzdušňovanie.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo oboznámiť sa s metodikou kultivácie explantátových kultúr a sledovať produkciu kalusových a suspenzných explantátových kultúr *Juniperus virginiana* 'Glauca' v priebehu 15 pasáží u oboch typov kultúr. U kalusovej kultúry bol sledovaný produkovaný obsah

podofylotoxínu v 32. až 46. pasáži, u kultúry suspenznej (odvodenej z kalusovej kultúry v 32. pasáži) rovnako obsah podofylotoxínu, avšak v 5. až 19. pasáži.

Pri už uvedenom experimente [39] bol pri kultivácii kalusovej kultúry *Juniperus chinensis* v tme oproti prvému dňu po 40 dňoch zaznamenaný nárast kultúry až jedenásťnásobne. Po piatich pasážovaniach však začalo dochádzať k znižovaniu proliferácie, ktorá bola po 10. pasáži úplne zastavená.

V tejto diplomovej práci sledované kalusové kultúry *Juniperus virginiana* kultivované na médiu rovnakého zloženia, avšak za svetelnej periódy 16 hodín svetla a 8 hodín tmy, proliferovali a produkovali podofylotoxín aj po 46 pasážach. Navyše bolo zaznamenané kontinuálne zvyšovanie produkcie od 40. pasáže (po prudkom zostupe v porovnaní s 39. pasážou) až po poslednú sledovanú 46. pasáž.

Z výsledkov produkcie kalusovej kultúry zobrazených v grafe č. 1 je jasné, že najvyšší nameraný obsah podofylotoxínu bol v pasáži č. 46, to znamená v poslednej nami sledovanej vzorke, a to 0,0515 %. Po druhej najvyššej nameranej hodnote (0,0375 %) v pasáži č. 39 došlo k výraznému spádu produkcie, avšak s následným kontinuálnym stúpaním obsahu až do spomínanej pasáže č. 46. Ostáva teda otáznе, či by obsah podofylotoxínu stúpал aj naďalej v ďalších sledovaných pasážach, alebo by došlo opäť k výraznejšiemu poklesu produkcie.

Rovnako aj u suspenznej kultúry *Juniperus virginiana* produkcia podofylotoxínu pokračovala až do v tejto práci poslednej sledovanej pasáže č. 19, a to dokonca v mierne zvýšených hodnotách oproti produkcii kalusovej kultúry. Najvyššia nameraná hodnota obsahu podofylotoxínu (0,060 %) bola v 18. pasáži, v nasledujúcej 19. pasáži bol zaznamenaný mierny pokles produkcie (0,0535 %), ako zobrazuje graf č. 2. Zaujímavý je tiež kolísavý priebeh produkovania podofylotoxínu. V sledovanom rozmedzí pasáží boli zaznamenané vrcholové hodnoty s následným poklesom produkcie, v pasáži č. 8 dokonca až na nulovú hodnotu.

Zaujímavý je tiež fakt, že v oboch typoch sledovaných kultúr došlo k výraznému nárastu produkcie podofylotoxínu práve v strede experimentu, a to v oboch prípadoch v 8. sledovanej pasáži, čo u kalusovej kultúry predstavuje pasáž č. 39 a u suspenznej kultúry pasáž č. 12.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že so zvyšujúcim sa počtom sledovaných pasáží (s dĺžkou kultivácie) nedošlo u kalusovej ani u suspenznej kultúry *Juniperus virginiana* k zastaveniu produkcie podofylotoxínu ako u druhu *Juniperus chinensis*.

U príbuzného druhu *Juniperus chinensis*, kultivovanom na SH médiu s vyššie zmienenými prídavnými látkami, bol obsah podofylotoxínu produkovaný kalusovou kultúrou stanovený na 0,005 % suchej váhy, čo je však dvojnásobne viac ako produkcia v listoch tejto rastliny. [39] Pre porovnanie, obsah podofylotoxínu získaný z listov intaktnej rastliny *Juniperus virginiana* dosahuje podľa istej štúdie [9] 0,14 % až 0,21 %, v niektorých vzorkách dokonca až nad 0,3 %. V explantátových kultúrach *Juniperus virginiana* je však produkcia podofylotoxínu v porovnaní s intaktnou rastlinou nízka. Preto je snaha zvýšiť ju metódou elicitácie alebo pridaním biogenetického prekursoru.

Na stimuláciu produkcie podofylotoxínu v explantátovej kultúre *Juniperus virginiana* [45] bol použitý biogenetický prekursor fenylalanín. 21denná aplikácia koncentrácie 10 mmol/l zvýšila produkciu kalusovej kultúry o 400 % v porovnaní s kontrolnou kultúrou na obsah 0,15 mg/g suchej hmotnosti. U novo odvodenej suspenznej kultúry bol zistený maximálny obsah podofylotoxínu 0,48 mg/g suchej hmotnosti po 14dennej aplikácii fenylalanínu koncentrácie 1 mmol/l, kedy došlo k zvýšeniu produkcie o 243 % oproti kontrole.

Zvýšená produkcia podofylotoxínu stimulovaná prídavkom fenylalanínu v koncentrácii 0,5 mg/ml bola pozorovaná aj v kultúre *Juniperus chinensis* po pätnástich dňoch od jeho prídania. Obsah podofylotoxínu tvoril 0,16 mg/g suchej váhy. Bez prídavku fenylalanínu produkcia kultúry nepresiahla obsah 0,05 mg/g suchej váhy. [39] Tiež v kultúre *Linum flavum* sa produkcia 6-metoxypodofylotoxínu podporuje až päťnásobne prídavkom L-fenylalanínu. [3]

V explantátovej kultúre *Podophyllum hexandrum* môže byť optimálna produkcia podofylotoxínu zabezpečená kultiváciou v MS médiu s obsahom 60 mM dusíka tvoreného amóniovými a nitrátovými iónmi v pomere 1:2, s doplnenou glukózou v koncentrácii 60 g/l a fosfátmi v koncentrácii 1,25 mM. [3]

Zvýšená produkcia podofylotoxínu explantátovou kultúrou je potvrdená prídavkom komplexu zloženého z prekursoru, ktorým je koniferyl alkohol, a β -cyklodextrínu do kultivačného média suspenznej kultúry *Podophyllum hexandrum*.

Výtťažok podofylotoxínu to zvýšilo z 0,003 % na 0,013 %. Koniferyl alkohol v nekomplexnej forme suspendovaný v médiu zvyšuje produkciu tiež, avšak menej výhodne. Ako prekursor je možné použiť aj koniferín s výtťažkom až 0,055 %, ten je však menej komerčne dostupný. [3]

Kalusová kultúra *Podophyllum hexandrum* v B5 médiu s prídavkom 2,4-D, kyseliny gibereľovej a 6-benzylaminopurínu dostatočne produkuje podofylotoxín a jeho deriváty. V kultúre *Podophyllum peltatum* bola zas prínosom kombinácia regulátorov rastu kinetínu a 2,4-D. Bolo zistené, že produkciu podofylotoxínu v tejto kultúre podporuje aj červené svetlo. [3, 29]

Stimulácia produkcie podofylotoxínu pomocou elicitácie bola v bunkovej kultúre *Linum album* pozorovaná po pridaní 10 μM kyseliny salicyľovej. V priebehu troch dní sa produkcia zvýšila až trojnásobne na 333 $\mu\text{g/g}$ suchej váhy. [40] Päťdňová elicitácia tejto kultúry chitosanovým hexamérom tiež zvýšila produkciu podofylotoxínu trojnásobne, a to na 73,5 $\mu\text{g/g}$ suchej váhy. [41] Podobne pôsobil aj extrakt z *Fusarium graminearum*. Jeho prítomnosť zvýšila množstvo podofylotoxínu až na 143 $\mu\text{g/g}$ suchej váhy. [42]

Pre zvýšenie výtťažku kultúry *Podophyllum hexandrum* pomocou permeabilizácie je možné použiť isopropanol v koncentrácii 0,5 %, nie však vo vyššej, tá má už na bunky deštrukčný efekt. [3]

Ovplyvnením produkcie podofylotoxínu v explantátových kultúrach rôznych druhov sa zaoberá mnoho ďalších experimentov, ktoré k dosiahnutiu žiadaného efektu využívajú rôzne vyššie spomínané metódy.

7. ZÁVER

Z výsledkov spracovaných vo vyššie uvedených tabuľkách a grafoch vyplýva:

1. V kalusovej kultúre *Juniperus virginiana* 'Glauca' bola v priebehu 15 pasáží (32.-46. pasáž) sledovaná produkcia podofylotoxínu. Bol zistený kolísavý charakter produkcie, ktorá bola zaznamenaná aj v poslednej sledovanej pasáži č. 46.
2. Najvyšší obsah podofylotoxínu produkovaný kalusovou kultúrou *Juniperus virginiana* 'Glauca' bol zistený v poslednej sledovanej pasáži č. 46 s hodnotou 0,0515 %.
3. V suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* 'Glauca' bola v priebehu 15 pasáží (5.-19. pasáž) sledovaná produkcia podofylotoxínu. Rovnako posledná sledovaná pasáž, teda pasáž č. 19, stále podofylotoxín produkovala.
4. Najvyšší obsah podofylotoxínu bol zistený v pasáži č. 18 suspenznej kultúry *Juniperus virginiana* 'Glauca', a to 0,060 %.
5. V sledovaných pasážach oboch typov kultúr nebol pozorovaný nezmenený kontinuálny nárast alebo pokles produkcie, práve naopak. Produkcia v priebehu 15 pasáží klesala aj narastala, keď po dosiahnutí vrcholovej hodnoty došlo k poklesu produkcie a opätovnému postupnému nárastu.
6. Z výsledkov vyplýva, že so zvyšujúcim sa počtom pasáží (s dĺžkou kultivácie) nedochádza u kalusovej ani u suspenznej kultúry *Juniperus virginiana* k zastaveniu produkcie podofylotoxínu. Naopak u oboch typov kultúr boli najvyššie hodnoty obsahu podofylotoxínu zaznamenané pri závere sledovania.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] YOUSEFZADI, M., SHARIFI, M., BEHMANESH, M., MOYANO, E., BONFILL, M., CUSIDO, R. M., PALAZON, J.: Podophyllotoxin: Current approaches to its biotechnological production and future challenges. *Engineering in Life Sciences*. 2010, 10, strany 281-292.
- [2] IONKOVA, I.: Anticancer Lignans - from Discovery to Biotechnology. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011, 11, strany 843-856.
- [3] FARKYA, S., BISARIA, B. S., SRIVASTAVA, A. K.: Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 65, strany 504-519.
- [4] GILMAN, E. F., WATSON, D. G.: Juniperus virginiana Eastern Redcedar. *Fact Sheet ST- 327*. Environmental Horticulture Department, University of Florida. 1993. [Online]. [Cit. 20.10.2016] Dostupné z: http://hort.ifas.ufl.edu/database/documents/pdf/tree_fact_sheets/junvira.pdf
- [5] JAHODÁŘ, L.: *Farmakobotanika Semenné rostliny*. Karolinum, Praha, 2009, strany 9-14, 35. ISBN 978-80-246-1791-6.
- [6] HEJNÝ, S., SLAVÍK, B.: *Květena ČSR I*. Academia, Praha, 1988, strany 333, 336-338. ISBN 21-069-87.
- [7] USDA Natural Resources Conservation Service: Juniperus virginiana L.-eastern redcedar. [Online]. [Cit. 21.10.2016] Dostupné z: http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=juvi_010_avp.tif
- [8] GILMAN, E. F., WATSON, D. G.: Juniperus virginiana ‘Glauca’ Silver Eastern Redcedar. *Fact Sheet ST-331*. Environmental Horticulture Department, University of Florida. 1993. [Online]. [Cit. 21.10.2016] Dostupné z: http://hort.ifas.ufl.edu/database/documents/pdf/tree_fact_sheets/junvire.pdf
- [9] CANTRELL, Ch. L., ZHELJAZKOV, V. D., OSBRINK, W. L. A., CASTRO, A., MADDOX, V., CRAKER, L. E., ASTATKIE, T.: Podophyllotoxin and essential oil profile of Juniperus and related species. *Industrial Crops and Products*. 2013, 43, strany 668-676.
- [10] RENOARD, S., LOPEZ, T., HENDRAWATI, O., DUPRE, P., DOUSSOT, J., FALGUIERES, A., FERROUD, C., HAGEGE, D., LAMBLIN, F., LAINE, E., HANO, Ch.: Podophyllotoxin and Deoxypodophyllotoxin in Juniperus bermudiana

- and 12 Other Juniperus Species: Optimization of Extraction, Method Validation, and Quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59, strany 8101-8107.
- [11] HRUBÍKOVÁ, K., BEŽO, M., KUTIŠOVÁ, J., ŽIAROVSKÁ, J., GAJDOŠOVÁ, A., OSTROLUCKÁ, M. G., HRICOVÁ, A., LIBIAKOVÁ, G.: *Explantátové kultúry rastlín*. SPU, Nitra, 2009, strany 8-9,12, 15-18, 22-25, 34-37, 68-70, 102-103. ISBN 978-80-552-0323-2.
- [12] FILOVÁ, A.: *Metodická príručka pre zakladanie a pestovanie rastlín a drevín v podmienkach in vitro*. Polymedia, Nitra, 2015, strany 11-12, 22-26, 38-39, 66-70, 74-75, 87. ISBN 978-80-970764-3-6.
- [13] BENNET, R. N., WALLSGROVE, R. M.: Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 1994, 127, strany 617-633.
- [14] RAO, S. R., RAVISHANKAR, G. A.: Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2012, 20, strany 101-153.
- [15] SLANINA, J.: Biologická a farmakologická aktivita lignanů. *Chemické listy*. 2000, 94, strany 111-116.
- [16] ZHELJAZKOV, V. D., CANTRELL, Ch. L., DONEGA, M. A., ASTATKIE, T.: Bioprospecting for podophyllotoxin in the Big Horn Mountains, Wyoming. *Industrial Crops and Products*. 2013, 43, strany 787-790.
- [17] ARROO, R. R. J., ALFERMANN, A. W., MEDARDE, M., PETERSEN, M., PRAS, N., WOOLLEY, J. G.: Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochemistry Reviews*. 2002, 1, strany 27-35.
- [18] TOMKO, J., KRESÁNEK, J., HUBÍK, J., SUCHÝ, V., FELKLOVÁ, M., SIKYTA, B., LIBICKÝ, A.: *Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty, 2. opr. vydanie*. Osveta, Martin, 1999, strana 323. ISBN 80-8063-014-3.
- [19] LIU, Y.-Q., TIAN, J., QIAN, K., ZHAO, X.-B., MORRIS-NATSCHKE, S. L., YANG, L., NAN, X., TIAN, X., LEE, K.-H.: Recent Progress on C-4-Modified Podophyllotoxin Analogs as Potent Antitumor Agents. *Medicinal Research Reviews*. 2015, 35, strany 1-62.
- [20] KUSARI, S., ZÜHLKE, S., SPITELLER, M.: Chemometric Evaluation of the Anti-cancer Pro-drug Podophyllotoxin and Potential Therapeutic Analogues in Juniperus and Podophyllum Species. *Phytochemical Analysis*. 2011, 22, strany 128-143.

- [21] PETERSEN, M., ALFERMANN, A. W.: The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 55, strany 135-142.
- [22] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada, Praha, 2002, strana 543. ISBN 8071699764.
- [23] GUERRAM, M., JIANG, Z.-Z., ZHANG, L.-Y.: Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2012, 10, strany 161-169.
- [24] PREŤOVÁ, A., OBERT, B., HRICOVÁ, A., KLUBICOVÁ, K., HAJDUCH, M., UVÁČKOVÁ, Ľ., LIBANTOVÁ, J., MORAVČÍKOVÁ, J., MATUŠÍKOVÁ, I.: *Biotechnológia ako nástroj moderného poľnohospodárstva na prekonanie predvídaných klimatických zmien (sucho, zvýšená teplota)*. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Nitra, 2011, strany 10-11, 13-15, 23, 30-33. ISBN 978-80-970662-0-8.
- [25] VODRÁŽKA, Z.: *Biotechnologie*. Academia, Praha, 1992, strany 64-65, 69, 72-73. ISBN 80-200-0293-6.
- [26] NOVÁK, F. J.: *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia, Praha, 1990, strany 13, 17-18, 26-28, 70. ISBN 80-200-0344-4.
- [27] HUDÁK, J., DVOŘÁK, M., HERICHOVÁ, A., LUX, A., NÁTR, L., PETERKOVÁ, I.: *Biológia rastlín*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, 1991, strany 209-218. ISBN 80-08-01598-5.
- [28] BHATIA, S., SHARMA, K., DAHIYA, R., BERA, T.: *Modern applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Academic Press, Boston, 2015, strany 51, 54-60, 70, 77-80, 82-83, 85-86, 91-92, 94-95, 240, 253-254, 258. ISBN 978-0-12-802221-4.
- [29] DiCOSMO, F., MISAWA, M.: Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*. 1995, 13, strany 425-453.
- [30] DÖRNENBURG, H., KNORR, D.: Strategies for improvement of secondary metabolite production in plant cell culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995, 17, strany 674-684.
- [31] NEUMANN, K.-H., KUMAR, A., IMANI, J.: *Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology*. Springer, Berlin, 2009, strany 22, 158-159, 202. ISBN 978-3-540-93882-8.

- [32] KRAIC, J., FARAGÓ, J., OSTROLUCKÁ, M. G., LIBANTOVÁ, J., MORAVČÍKOVÁ J., JOMOVÁ, K., HRAŠKA, Š.: *Biotechnologie rostlin*. Univerzita Konštantína Filozofa, Fakulta prírodných vied, Nitra, 2011, strany 34-35, 41-42, 48-49, 55, 57-59, 61, 68, 92, 142. ISBN 978-80-8094-885-6.
- [33] PODLEŠÁKOVÁ, K., TARKOWSKÁ, D., PĚNČÍK, A., OKLEŠŤKOVÁ, J., TUREČKOVÁ, V., FLOKOVÁ, K., TARKOWSKI, P.: Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy*. 2012, 106, strany 373-379.
- [34] XU, J., GE, X., DOLAN, M. C.: Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*. 2011, 29, strany 278-299.
- [35] ZHAO, J., DAVIS, L. C., VERPOORTE, R.: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2005, 23, strany 283-333.
- [36] KOVÁČ, J.: *Explantátové kultury rostlin*. Univerzita Palackého, Olomouc, 1995, strany 1, 16, 19-20, 26, 50, 52. ISBN 80-7067-493-8.
- [37] SIKYTA, B., DUŠEK, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*. Karolinum, Praha, 1992, strany 10, 87, 94. ISBN 80-7066-642-0.
- [38] KOVÁČ, J.: *Explantátové kultury rostlin*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Fakulta pedagogická, Ústí nad Labem, 1992, strany 8-9, 18-20. ISBN 80-7044-036-8.
- [39] MURANAKA, T., MIYATA, M., ITO, K., TACHIBANA, S.: Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. *Phytochemistry*. 1998, 49, strany 491-496.
- [40] YOUSEFZADI, M., SHARIFI, M., BEHMANESH, M., GHASEMPOUR, A., MOYANO, E., PALAZON, J.: Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. *Biotechnology Letters*. 2010, 32, strany 1739-1743.
- [41] BAHABADI, S. E., SHARIFI, M., MURATA, J., SATAKE, H.: The effect of chitosan and chitin oligomers on gene expression and lignans production in *Linum album* cell cultures. *Journal of Medicinal Plants*. 2014, 13, strany 46-53.
- [42] BAHABADI, S. E., SHARIFI, M., SAFAIE, N., MURATA, J., YAMAGAKI, T., SATAKE, H.: Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. *Plant Biotechnology Reports*. 2011, 5, strany 367-373.

- [43] SCHENK, R. U., HILDEBRANDT, A. C.: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 1972, 50, strany 199-204.
- [44] KAŠPAROVÁ, M., SPILKOVÁ, J., CVAK, L., SIATKA, T., MARTIN, J.: Plant tissue cultures of *Juniperus virginiana* L. *Natural Product Communications*. 2016, 11, strany 681-683.
- [45] KAŠPAROVÁ, M., MARTIN, J., TŮMOVÁ, L., SPILKOVÁ, J.: Production of Podophyllotoxin by Plant Tissue Cultures of *Juniperus virginiana* L. *Natural Product Communications*. 2017, 12, strany 101-103.

9. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. č. 1. <i>Juniperus virginiana</i> - list [7]	8
Obr. č. 2. Podofylotoxín [19].....	15
Obr. č. 3. Deriváty podofylotoxínu - etoposid, teniposid, etopofos [19].....	15
Obr. č. 4. Deriváty podofylotoxínu - deoxypodofylotoxín a epipodofylotoxín [2].	16
Obr. č. 5. Biosyntéza podofylotoxínu [23]	17
Obr. č. 6. Rastová krivka [28].....	24
Obr. č. 7. Kalusová kultúra <i>Juniperus virginiana</i> , varieta 'Glauca'	43
Obr. č. 8. Suspenzná kultúra <i>Juniperus virginiana</i> , varieta 'Glauca'.....	43
Obr. č. 9. Kultivácia suspenzných kultúr na trepačke	44
Obr. č. 10. Kalibračná krivka podofylotoxínu	45
Obr. č. 11. Príklad chromatografického záznamu	46

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognózie

Študent: Alica Pakánová

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Sekundární metabolity rostlinných kultur *in vitro* II

Diplomová práca sa zaoberá kalusovými a suspenznými kultúrami *Juniperus virginiana* 'Glauca', konkrétne stanovením ich produkcie určeného sekundárneho metabolitu. Bol pozorovaný produkovaný obsah podofylotoxínu v priebehu 15 pasáží u oboch typov kultúr. Najvyšší obsah podofylotoxínu (0,060 %) bol preukázaný v 18. pasáži suspenznej kultúry odvodenej z trojročnej kalusovej kultúry a potom pasážovanej v 21dňových intervaloch. Maximálny stanovený obsah podofylotoxínu produkovaný kalusovou kultúrou (0,0515 %) bol zistený v 46. pasáži. To bola zároveň posledná sledovaná pasáž tejto kultúry, ktorá bola pasážovaná v intervale 28 dní. Z výsledkov vyplýva, že so zvyšujúcim sa počtom pasáží nedochádza u kalusovej ani u suspenznej kultúry *Juniperus virginiana* k zastaveniu produkcie.

Kľúčové slová: Suspenzné kultúry, kalusové kultúry, produkcia sekundárnych metabolitov, *Juniperus virginiana*, podofylotoxín.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Student: Alica Pakánová

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Secondary metabolites of plant cultures *in vitro* II

Diploma thesis is focused on callus and suspension plant cultures of *Juniperus virginiana* 'Glaucá' and their production of secondary metabolite. Produced content of podophyllotoxin was observed during 15 subcultivations for both types of cultures. The highest content of podophyllotoxin (0.060 %) was established in the 18th subcultivation of suspension culture derivated from the three-years-old callus culture and then subcultivated in the period of 21 days. The maximal content of podophyllotoxin produced by callus culture (0.0515 %) was found out in the 46th subcultivation. Simultaneously it represented the last observed subcultivation subcultivated in the period of 28 days. This research shows that nor the production of *Juniperus virginiana* callus culture neither the production of suspension culture is stopped by increased number of subcultivation.

Keywords: Suspension cultures, callus cultures, production of secondary metabolites, *Juniperus virginiana*, podophyllotoxin.