

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

---

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Produkcia podofylotoxínu v explantátovej kultúre  
*Juniperus virginiana*

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

Poverený vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, september 2018

Veronika Vargovčíková

## Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala PharmDr. Marii Kašparovej, Ph.D. za pomoc, trpezlivosť, ochotu a cenné rady pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Moja vďaka tak isto patrí mojej 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.“

.....  
Veronika Vargovčíková

# OBSAH

1.	ÚVOD.....	6
2.	CIEĽ PRÁCE.....	8
3.	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
3.1	Explantátové kultúry rastlín.....	9
3.1.1	Založenie explantátovej kultúry.....	10
3.1.2	Kalusové kultúry.....	12
3.1.3	Suspenzné kultúry.....	13
3.1.4	Zloženie kultivačných médií.....	15
3.2	Elicitácia.....	18
3.2.1	Elicitor.....	18
3.2.1.1	Abiotické elicitory.....	18
3.2.1.1	Biotické elicitory.....	19
3.2.2	Faktory ovplyvňujúce elicitáciu.....	19
3.2.3	Mechanizmus elicitácie.....	20
3.3	Salicylová kyselina.....	22
3.4	Škoricová kyselina.....	24
3.5	Borievka virgínska.....	25
3.5.1	Použitie.....	28
3.5.2	Obsahové látky.....	29
3.6	Podofylotoxín.....	29
3.6.1	Chemická štruktúra podofylotoxínu.....	29
3.6.2	Farmakologická aktivita podofylotoxínu a jeho derivátov.....	31
3.6.3	Zdroje podofylotoxínu.....	32
3.6.4	Mechanizmus účinku.....	33

3.6.5	Syntéza vedúca k podofylotoxínu.....	35
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	39
4.1	Pomôcky a prístrojové vybavenie.....	39
4.2	Chemikálie.....	39
4.3	Rastlinný materiál.....	40
4.4	Nástroje a kultivačné nádoby .....	40
4.5	Príprava kultivačného média.....	40
4.6	Pasážovanie a kultivácia suspenzných kultúr.....	42
4.7	Ovplyvnenie produkcie podofylotoxínu.....	42
4.8	Priebeh pokusov a odber kultúr.....	43
4.9	Stanovenie obsahu podofylotoxínu.....	43
4.9.1	Príprava vzorky.....	43
4.9.2	Podmienky HPLC analýzy.....	44
4.10	Štatistické spracovanie dát.....	45
5.	VÝSLEDKY.....	47
5.1	Tabuľky.....	47
5.2	Grafy.....	50
6.	DISKUSIA.....	52
7.	ZÁVER.....	57
8.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	58
9.	ZOZNAM OBRÁZKOV.....	66
10.	ABSTRAKT.....	67
11.	ABSTRACT.....	69

# 1. ÚVOD

Vyššie rastliny sú bohatým zdrojom bioaktívnych zložiek, ktoré sú využívané v chemickom a farmaceutickom priemysle, ako liečivá, agrochemikálie, arómy, vonné látky, farby, biopesticídy a potravinárske prídavné látky. [1] V súčasnosti sa predpokladá, že biogénne látky rastlinného pôvodu alebo z nich získané deriváty, obsahuje 1/3 vyrábaných liečivých prípravkov. [2] Zopár významných látok prírodného pôvodu sa používa aj k liečbe rakoviny, ako vinkristin, vinblastin, paklitaxel a podofylotoxín, ktorý slúži na syntézu polosyntetických derivátov s protinádorovou aktivitou. [3]

Najbohatším zdrojom podofylotoxínu je živica získaná z podzemkov rodu *Podophyllum*. Kvôli nadmernému zberu bol *Podophyllum hexandrum* vyhlásený za ohrozený. Aj rody *Linum*, *Juniperus*, *Thymus*, *Thuja* a ďalšie, obsahujú podofylotoxín. *Juniperus virginiana* L. je možné označiť ako alternatívny zdroj pre získavanie podofylotoxínu. [3,4]

Niekoľko dôležitých prírodných produktov je možné syntetizovať kvôli ich jednoduchej chemickej štruktúre. Komplexné zlúčeniny, ako je podofylotoxín, kvôli jeho zložitej štruktúre a chiralite, je veľmi náročné syntetizovať. Často sú náklady na syntézu týchto zlúčenín enormné, čím je obmedzená ich dostupnosť. [4,5]

Vývoj explantátových kultúr na produkciu sekundárnych metabolitov prebieha už niekoľko desaťročí. Kultúry rastlinných buniek na produkciu sekundárnych metabolitov sľubujú potenciálne alternatívne zdroje. [5] Výhodami *in vitro* kultivácií je fakt, že vznikne požadovaný produkt so zabezpečenou prísnu kontrolou výroby a kvality, dá sa zozbierať kdekoľvek na svete, materiál je nekontaminovaný, dostupnosť je nezávislá na geografických a enviromentálnych podmienkach, možnosť zachovať ohrozené druhy rastlín, rastové cykly trvajú kratšiu dobu ako v intaktnej rastline. [1]

Keďže dopyt po podofylotoxíne prekračuje ponuku, rastlinné bunkové suspenzné kultúry *Juniperus virginiana* L. (*Cupressaceae*) sa zdajú ako vhodná alternatíva. Prekážkou je však ich nízka produktivita, ktorá bráni ich komerčnému využitiu. Elicitácia je jednou z najúčinnějších stratégií na zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov. [1,3,5]

Problematikou elicitácie suspenzných kultúr *Juniperus virginiana* L. varieta 'Glauca' a 'Hetzii' biotickým elicitorom (kyselinou salicylovou) a prekurzorom fenypropánového metabolizmu (kyselinou škoricovou) sa zaoberá táto diplomová práca.

## 2. CIEĽ PRÁCE

1. Zoznámiť sa s metodikou kultivácie a elicitácie rastlinných explantátových kultúr *in vitro*.
2. Sledovať vplyv elicitácie (kyselina salicylová) a vplyv prekurzoru fenypropánového metabolizmu (kyselina škoricová) na produkciu podofylotoxínu suspenznou kultúrou *Juniperus virginiana* (varieta 'Glauca' a 'Hetzii').



## 3. TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Explantátové kultúry rastlín

Predstavujú kultiváciu buniek, tkanív, orgánov alebo ich častí v kultivačných médiách v aseptickom prostredí za definovaných fyzikálnych a chemických podmienok *in vitro*. [6,7]

*In vitro* kultivačné techniky sú dôležité kvôli produkcii rastlín bez výskytu chorôb, rýchle množenie vzácnych rastlín, transformáciu rastlinného genómu a na produkciu metabolitov odvodených z rastlín. [7]

História explantátových kultúr sa datuje do obdobia kedy Haberlandt (1902) sformuloval koncept totipotencie. Jedná sa o proces, kedy z akejkoľvek plnohodnotnej bunky rastliny môže vzniknúť akékoľvek pletivo dokonca i celá rastlina. Totipotencia sa u diferencovanej bunky prejaví po dediferenciácii. To znamená, že diferencovaná bunka sa štrukturálne i funkčne dostane do štádia zygoty, meristematickej alebo embryonálnej bunky. Dôjde k obnoveniu delenia. Delenie musí byť prísne organizované s nastolenou bunkovou i orgánovou polaritou, aby nevznikol kalus, ale organizované štruktúry. [8]

Explantátové kultúry môžeme deliť podľa rôznych hľadísk.

Podľa schopnosti zachovať si genetickú stabilitu:

- ❖ Kultúry umožňujúce vznik genetickej variability – protoplastové, kalusové a suspenzné kultúry.
- ❖ Kultúry zachovávajúce si genetickú stabilitu – embryokultúry, meristémové kultúry, mikropropagácia *in vitro*.

Podľa kultivovaného explantátu alebo charakteru pletiva:

- ❖ Organizované kultúry:

embryokultúry – zisk životaschopnej rastliny kultiváciou *in vitro* z nezrelého (proembrya) alebo zo zrelého embrya,

orgánové kultúry – diferencovaný orgán je východiskovým explantátom. Meristémové, nodálne kultúry a kultúry izolovaných koreňov patria medzi

kultúry vegetatívnych orgánov. Medzi kultúry generatívnych orgánov patria peľnicové a peľové kultúry.

❖ Neorganizované kultúry:

protoplastové – tvorené bunkami bez bunkovej steny,

kalusové – vznikajú z diferencovaných buniek orgánov alebo pletív, ktoré sa dediferenciáciou premieňajú na nediferencované bunky – kalus,

bunkové – bunky alebo zhľuky buniek kultivovaných v tekutom médiu. [9]

### 3.1.1 Založenie explantátovej kultúry

Základom je výber vhodnej rastliny a jej častí. Tento výber je veľmi dôležitý pre úspešné založenie stabilnej kultúry. Závisí aj od cieľa štúdie. Preferujú sa rastliny bez chorôb a hmyzu, teda dbá sa na zdravotný a fyziologický stav rastlín, a zohľadňujú sa aj ich rastové schopnosti. [6,7,10,11]

Aby bola explantátová kultúra úspešne odvodená je nutné zobrať do úvahy aj ročné obdobie i postavenie odobratej časti rastliny v rámci celej rastliny. Svoj význam zohráva rôzne obdobie roku a stanovište aj v prípade mikrobiálnej kontaminácie. [10]

Po odobratí rastlinného materiálu je rýchlo prevezený do laboratória. Pri prevoze je snaha zabrániť mechanickému poškodeniu a kontaminácii rastliny. [10] V niektorých prípadoch, keď je kontaminácia materiálu veľká a sterilizácia nedostatočná, je nutné použitie opakovanej sterilizácie v intervale 24-48 hodín. [6]

Kontamináciu patogénmi v intracelulárnych priestoroch nie je možné eliminovať bežnými postupmi používanými pri dezinfekcii. V tomto prípade je možná aplikácia antibiotík do kultivačného média alebo na povrch materiálu. [6,10]

Dôležitosť použitia sterilného materiálu pri založení explantátovej kultúry podporuje aj fakt, že až 95% kultúr je kontaminovaných, ak sterilizácia nebola dostatočne dôkladná. [6]

K sterilizácii používame dezinfekčné roztoky, ktoré nesmú poškodiť pletivá rastliny, ale musia zničiť patogény. Použitie vysokých teplôt na sterilizáciu nie je vhodné, práve preto volíme dezinfekčné roztoky. [6]

Iniciácia kultúry *in vitro* vyžaduje upravenie vzorky (explantátu). Explantáty sa potom umiestnia do vhodných kultivačných médií a prenesú sa v kadičkách s kultivačným médiom uzavretými hliníkovou fóliou z aseptického boxu do kultivačnej miestnosti. Inkubujú sa krátky čas (2-3 dni). Zisťuje sa, či nie sú infikované. Je možné stretnúť sa aj s tým, že explantovaný materiál nepodľahol infekcii, ale nerastie, poprípade je sfarbený do hneda až čierna. Nastáva to hlavne v situácii, kedy bola koncentrácia sterilizovaného roztoku príliš vysoká alebo doba pôsobenia príliš dlhá. [7,10]

Hnednutie alebo sčernenie kultúry môže vzniknúť v dôsledku interakcie enzýmov obsahujúcich meď (polyfenoloxidáza) a natívnych polyfenolov. Tieto zmeny častejšie pozorujeme u starších pletív. Týmto zmenám sa dá zabrániť pridaním kyseliny askorbovej, a tým zmenou redoxného potenciálu, redukciou dostupnosti substrátu fenoláz a ich aktivity, inaktiváciou fenoláz, odstránením zlúčenín fenolu. [10]

Hnednutiu explantátu zabránime častejším pasážovaním, k väzbe fenolov sa využíva väzbová schopnosť polyvinylpyrrolidónu alebo čierneho uhlia, odporúča sa aj použitie antioxidantov, napr.: glutatiónu, kyseliny askorbovej, citrónovej, fluoroglucinolu. [10]

Pre prežitie kultúry je nutné ju pasážovať na čerstvé médium jednak kvôli vyčerpávaniu živín, ale aj pre zbavenie sa látok vylúčených do média, aby nebrzdili rast kultúry. [10]

Existuje viacero možných spôsobov pre pestovanie explantátových kultúr. Jednými z najčastejších metód sú organogéza, ktorá sa týka produkcie rastlinných orgánov (koreňov alebo výhonkov). Táto metóda sa môže uskutočniť nepriamo z dediferencovaných buniek (kalusu) alebo priamo z meristémov. Kultúry, ktoré vzniknú, sa môžu neskôr použiť na rast konkrétnych orgánov (koreňov vo vlasovej koreňovej kultúre) alebo na masívnu výrobu rastlín (mikropropagáciu). [7]

Kalogenéza je charakterizovaná produkciou amorfnej masy buniek po vystavení explantátov rôznym rastovým regulátorom. Kalus sa potom môže použiť na vytvorenie suspenzných kultúr a produkciu sekundárnych metabolitov alebo na regeneráciu celých rastlín. [9,12]

### 3.1.2 Kalusové kultúry

Úspešná produkcia kalusovej kultúry závisí od poskytnutých podmienok a druhu rastliny. Nutnosť vhodného výberu materiálu a jeho sterility je popísaná v predchádzajúcej kapitole 3.1.1 Založenie explantátovej kultúry. Na indukciu kalusového tkaniva sa používajú korene, stonky, listy, kvety semená a mnoho ďalších častí predovšetkým z mladých rastlín. [13]

Po niekoľkých týždňoch kultivácie sa objavuje primárny kalus. Takto sa nazýva kalus vytvorený na pôvodnom explantáte. [11,13]

Z kúskov tkaniva odobratých z primárneho kalusu sú iniciované sekundárne kalusové kultúry. [13]

Ak explantát obsahuje diferencované bunky musí sa predtým ako dôjde k bunkovému deleniu uskutočniť dediferenciácia. V podstate bunky prechádzajú zmenami, aby sa stali meristematičnými. Meristematičné bunky majú delivú funkciu. Ak explantát po izolácii obsahuje iba meristematičné tkanivo, bunkové delenie sa môže uskutočniť bez predchádzajúcej dediferenciácie. Proces dediferenciácie zahŕňa možnosť dočasného vrátenia dospelých buniek do štádia mladších. Tieto mladé bunky majú väčší potenciál rastu a delenia. Bunka stráca dediferenciáciou morfológickú a funkčnú špecializáciu a môže prejsť svoju totipotenciu. Za určitých okolností sú schopné regenerovať orgány a/ alebo embryá. Pravidelným pasážovaním je zabezpečená schopnosť trvalej proliferácie buniek. [8,13]

Kultivačné médium k indukcii rastu kalusu vo väčšine prípadov obsahuje relatívne vyššiu koncentráciu auxínov v porovnaní s koncentráciou cytokinínov. [6]

Pri regenerácii rastlín v kalusových, ale aj suspenzných kultúrach je riziko vzniku epigenetických zmien. Toto riziko je vyššie, ak sa použijú diferencované pletivá k založeniu kultúry. V tomto prípade možnosť genetickej variability stúpa kvôli tomu, že regenerácia rastlín je viazaná na dediferenciáciu a tvorbu kalusov. Najviac sa genetická nestabilita prejavuje v dlhodobých kalusových a suspenzných kultúrach. [6]

Kalusová kultúra sa dá definovať aj ako neorganizované tkanivo, ktoré obsahuje diferencované (východiskový materiál pre indukciu kalusu, napr.: koreň, výhonky listy...) ako aj nediferencované bunky. [13]

Samotný kalus je zložený z amorfnej hmoty málo usporiadaných tenkostenných parenchymatických buniek, vznikajúcich z proliferujúcich materských buniek tkaniva. Dôsledkom zranení dochádza často k vytvoreniu kalusu na zranenom konci stonky alebo koreňa. [13]

Kalusové kultúry sa môžu využiť na vegetatívne množenie rastlín, šľachtenie nových odrôd, získanie rastlín bez patogénov alebo odolných voči patogénom, produkciu sekundárnych metabolitov. [9]

### **3.1.3 Suspenzné kultúry**

Suspenzná bunková kultúra môže byť definovaná ako samostatné bunky alebo skupiny buniek z kalusových kultúr, kultivovaných rozptýlene v tekutom médiu, ktoré sú udržiavané za vhodných podmienok týkajúcich sa prevzdušnenia, miešania, teploty, svetla a iných fyzikálnych parametrov. [6,14]

Vlastnosťou suspenzných kultúr je, že nerastú ako jednotlivé bunky, ale tvoria zhluky buniek. Pôvodne ideálna homogénna kultúra sa môže pri dlhšej kultivácii v dôsledku genetických a metabolických zmien stať kultúrou heterogénnou. Okrem bunkových agregátov sa vytvárajú i vakuolizované nedeliace sa bunky. [10]

Vo všeobecnosti sú veľké zhluky buniek nežiaduce, kvôli zníženej dostupnosti živín a kyslíka v strede zhluku. [15]

Suspenzná kultúra vznikne inokuláciou časti rozpadavého kalusu do kvapalného média. [6,14]

Doporučený objem kultivačného média v banke je 1/5 celkového objemu banky. [10]

Kultúry sa potom udržujú v sklenených bankách pri kontinuálnom miešaní na horizontálnych alebo rotačných trepačkách, čím je zaistené dostatočné množstvo kyslíka, priamy kontakt s tekutým živným médiom a dochádza k rozpadu zhlukov buniek vznikajúcich pri delení. [6,14]

V porovnaní s kalusovou kultúrou je rast suspenznej kultúry rýchlejší, čím dochádza aj k rýchlejšiemu odčerpávaniu živín z média. Aby bunky stále rástli musí dochádzať pomerne k častému pasážovaniu kultúry na čerstvé kultivačné médium. [6]

Pre kontinuálnu kultiváciu veľkých množstiev metabolitov môžu byť kultúry prevedené do špecializovaného bioreaktoru. Medzi nevýhody rastlinných buniek

patria: menej stabilná produktivita, nízke požiadavky na kyslík, výskyt zhlukov buniek a pomalý rast. Vzhľadom k týmto vlastnostiam a odlišnostiam buniek sa stretávame s odlišnými bioreaktormi u rôznych typov buniek. [5,14]

Porovnávaním s konvenčnými metódami kultivácie majú suspenzné kultúry tieto výhody:

- ❖ nevzťahujú sa na sezónne a geografické obmedzenia a ďalšie environmentálne rozdiely,
- ❖ ide o stabilnú výrobnú platformu, ktorá zaistí kontinuitu produkcie prírodných zlúčenín jednotnej kvality a výnosu,
- ❖ efektívnejšia v porovnaní s kalusovou kultúrou,
- ❖ je rýchla,
- ❖ možnosť syntetizovať nové produkty, ktoré sa bežne nevyskytujú v rastlinách z relatívne lacných prekursorov, lebo rastlinné bunky môžu vykonávať stereo- a regiošpecifické biotransformácie. [5,16]

Využívajú sa nielen na získanie sekundárnych metabolitov z rastlín, hľadanie nových zlúčenín, možnosť produkcie rekombinantných proteínov, ale aj na výskum fyziológie, biochémie rastlinných buniek a kultúr protoplastov. [5]

Sekundárne metabolity môžu byť definované ako zlúčeniny, ktoré nie sú nevyhnutne potrebné pri udržiavaní základných životných procesov v rastlinách, ale zohrávajú dôležitú úlohu pri interakcii rastliny s prostredím. Produkcia týchto zlúčenín v rastlinách je často nízka a závisí od fyziologického a vývojového štádia rastliny. [17]

Sekundárne metabolity môžu byť použité ako farmaceutické látky, agrochemické biopesticídy, kozmetické látky, arómy, potravinárske prídavné látky, vonné látky a pigmenty. Príklady niektorých sekundárnych metabolitov produkovaných pre farmaceutické použitie za pomoci bunkových suspenzných kultúr: paklitaxel z rodu *Taxus* má protinádorové účinky, deriváty šikonínu z *Lithospermum erythrorhizon* majú antimikrobiálne, protizápalové, protinádorové, berberín z *Coptis japonica* má protirakovinové, antibiotické a protizápalové účinky, sanguinarín z *Papaver somniferum*, ajmalicín z *Catharantus roseus* antihypertenzívne účinky, ginsenosidy

z *Panax ginseng* používané ako tonikum a mnoho ďalších. Prvé štyri uvedené látky sa vyrábajú na priemyselnej úrovni. [5,16]

Veľkým úspechom je odvodenie rekombinantného proteínu pre farmaceutické účely z rastlín - taligluceráza alfa (Elelyso®). Jeho produkcia prebieha v kultúrach suspenzných rastlinných buniek. [15]

Problémom pri produkcii sekundárnych metabolitov zo suspenzných bunkových kultúr ostáva nestabilita bunkových línií, nízke výnosy a problémy so zväčšovaním kultúry. [16]

Existuje niekoľko stratégií používaných na zvýšenie výnosov v suspenzných kultúrach: výber vysoko produkujúcich bunkových línií, optimalizácia podmienok kultivácie, použitie dvojfázového kultivačného systému, pridanie prekursorov alebo elicitorov, metódy metabolického inžinierstva. [5]

### **3.1.4 Zloženie kultivačných médií**

Základnou funkciou kultivačného média je zabezpečiť živiny a energiu pre delenie, a diferenciáciu buniek. Kultivačné média majú schopnosť ovplyvniť indukciu kalusu a významne prispievajú aj k rastu samotných rastlinných pletív, a orgánov. [9]

Pre rôzne účely kultivácie a druhy rastlín sa používajú rôzne média. Prvé médium popísal White v roku 1963. Medzi ďalšie často používané patria: Murashige a Skoog (MS), Linsmaier and Skoog (LS), Gamborg (B5), Shenk a Hildebrandt (SH), Lloyd a McCown a ďalšie. Vysoký obsah makroelementov je špecifický pre MS, SH a B5 médiá. [6,10]

Kultivačné média obsahujú zvyčajne tieto zložky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny alebo iný zdroj organického dusíku, sacharidy, nedefinované organické zložky, regulátory rastu a spevňujúce látky. [6]

**Makroelementy** – draslík, vápnik, horčík, fosfor, síra a dusík sú nevyhnutné pre rast. Sú prítomné vo forme solí vo vyššej koncentrácii ako mikroelementy. Kalusové a suspenzné kultúry sú charakterizované potrebou vyššej koncentrácie makroelementov v kultivačnom médiu, v porovnaní s orgánovými kultúrami. Dusík, fosfor, síra majú podstatný význam v syntéze nukleotidov, vápnik v syntéze bunkových stien, horčík v integrite membrán buniek, draslík reguluje osmotické

zmeny, energetický metabolizmus, účastní sa aj metabolizmu bielkovín a cukrov. [6,9]

**Mikroelementy** - mangán, zinok, meď, bór, železo a molybdén. V niektorých prípadoch sa do média pridávajú sodík, chlór, jód a kobalt, ktoré nemusia byť nevyhnutné pre rast kultúry. V chelátovej forme sa do kultivačného média dodávajú železo a zinok. [6,9]

**Zdroj energie a uhlíku** - explantáty nemajú schopnosť vyživovať sa autotrofne, preto je pre nich nutný zdroj uhlíku, ktorým je najčastejšie sacharóza. Vlastnosťou sacharózy je úprava osmotickej hodnoty média a ak neprebehla sterilizácia dostatočne, umožní rast mikróbov. Ďalším zdrojom sú sacharidy, ako glukóza alebo fruktóza. [6,10]

**Vitamíny** – ich význam spočíva v katalýze rôznych metabolických procesov. Keďže v *in vitro* podmienkach si ich explantátové časti nie sú schopné v dostatočnej miere syntetizovať, musia byť dodávané do kultivačných médií. Patria tu pyridoxín, kyselina nikotínová, tiamín, myo-inozitol. Myo-inozitol je sacharid. Aktivuje syntézu pektínov, fosfolipidov (fosfatidylinozitol a fosfoinozitol) a reguluje osmotický potenciál bunky. Iné vitamíny, ktoré nie sú až tak nutné v kultivačných médiách sú kyselina askorbová, listová, pantoténová, biotín, riboflavín, vitamín E. [6,9]

**Aminokyseliny** – rastlinné bunky, ktoré sú kultivované, si samostatne vedú syntetizovať všetky potrebné aminokyseliny. Niektoré z aminokyselín po dodaní do média podporujú rast. [6]

Na dodanie dusíka v organickej forme sa používa zmes aminokyselín (hydrolyzát kazeínu), ale aj jednotlivé aminokyseliny L-asparagín, L-glutamín a glycín. Avšak jednotlivé aminokyseliny inhibujú vo vysokých koncentráciách rast kultúry. [6]

**Organické zložky médií, ktoré sú nedefinované** – sladový, kvasničný extrakt, kokosové mlieko, hydrolyzát kazeínu, šťava z pomaranča alebo paradajok. Ich použitie bolo častejšie hlavne v minulosti. [6]

**Látky spevňujúce médium** – na vytvorenie tuhých médií sa najčastejšie používa agar. Výhody agarových gélov sú stabilita pri teplotách, ktoré sa používajú pri kultivácií, nie je rozkladaný rastlinnými enzýmami a nereaguje s ostatnými zložkami v médiu. Ďalšie látky pre spevnenie média sú agaróza, Phytigel a Gerlite. V tekutých



médiách sa explantáty ukladajú na sklenené guľičky, mostíky z filtračného papiera, na polyuretánovú penu, čadičovú vatú a iné. [6,10]

**Regulátory rastu** – sa delia na rastlinné hormóny (fytohormóny), ich syntetické deriváty a ostatné látky s regulačnou aktivitou. Fytohormóny sú organické látky vznikajúce v jednej rastlinnej časti a sú ďalej transportované do iných častí, v ktorých sú schopné aj pri veľmi malých množstvách ovplyvniť fyziologické reakcie. Rastlinné hormóny sú menej špecifické ako živočíšne. [9]

Rastlinné hormóny sú auxíny, cytokiníny, gibberelíny, etylén a kyselina abscisová. Medzi látky ostatné sa radia brassinosteroidy, polyamíny, kyselina jasmónová, fenolické látky a oligosacharidy. Dôvodom nezaradenia medzi fytohormóny je nedostatočne dokázaná univerzálnosť výskytu a ich vyššia koncentrácia v porovnaní s fytohormónmi. [9]

Auxíny - z prirodzene sa vyskytujúcich sú známe indoyl-3-octová (IAA), kyselina 4-chlór-indoyl-3-octová (4-chlór-IAA), kyselina fenyloctová (PAA), kyselina indoyl-3-maslová (IBA). Syntetické auxíny sa nazývajú aj auxinoidy a delíme ich na benzoové, naftalénové kyseliny, chlórphenoxykyseliny, a deriváty kyseliny pikolínovej. Auxíny majú schopnosť navodzovať delenie buniek, tvorbu kalusu, stimulovať rast do dĺžky, regulácia gravitropizmu a fototropizmu. Vysoká koncentrácia auxínov podporuje delenie buniek a vytváranie kalusu, ak je ich koncentrácia nízka dochádza skôr k stimulácii tvorby adventívnych koreňov. V *in vitro* podmienkach sa kombinujú rôzne koncentrácie auxínov a cytokinínov pre navodenie organogenézy. Ak je v médiu vyššie množstvo cytokinínov v porovnaní s auxínmi je prevažne stimulovaná tvorba axilárnych výhonkov. Ak je väčšie množstvo auxínov ako cytokinínov, tak je stimulovaná tvorba koreňov. [6,8,9,12]

Cytokiníny – z prirodzene sa vyskytujúcich sú známe a používané v kultivačných médiách: zeatín, 6-dimetylaminopurín (2iP), N<sup>6</sup>-benzyladenín (BA). BA bol dlho spolu s derivátmi pokladaný za syntetické, zistenia však dokazujú, že sa jedná o prírodné látky. Zo syntetických je známy kinetín (6-furfurylaminopurín). Do kultivačných médií sa pridávajú pre stimuláciu delenia buniek a tvorbu výhonkov. [6,9,12]

## 3.2 Elicitácia

Ide o techniku, ktorá zahŕňa exogénne prídanie elicitoru do rastového média, čím dôjde k vyvolaniu stresovej reakcie s následným zvýšením syntézy sekundárnych metabolitov. [1,18]

### 3.2.1 Elicitor

Môže byť definovaný ako látka, ktorá pri vložení do živého bunkového systému vyvolá alebo zlepši biosyntézu špecifických zlúčenín. [17] Pôsobenie elicitoru je schopné zvýšiť intenzitu odpovede rastliny na biotické a abiotické stresy, tým dôjde k zvýšenej syntéze signálnych zlúčenín, ako jasmónová kyselina, salicylová kyselina, etylén, oxid dusnatý a ďalších, a ich následný vplyv na produkciu sekundárnych metabolitov. [19,20]

Pôvodne bol tento termín použitý pre molekuly, ktoré boli schopné indukovať tvorbu fytoalexínov, no dnes sa takto bežne označujú zlúčeniny, ktoré sú schopné stimulovať ktorýkoľvek spôsob obrany. [1]

Elicitory delíme podľa dvoch kritérií a to podľa povahy (abiotické, biotické) alebo podľa pôvodu ( exogénne a endogénne). [1]

Elicitor sa pridáva v exponenciálnej fáze rastu, kedy je väčšina enzymatických pochodov aktívna, aby bola odpoveď na elicitor dostatočná. [21]

#### 3.2.1.1 Abiotické elicitory

Abiotické elicitory sú považované za látky nebiologického pôvodu. [1]

Patria medzi ne látky:

- ❖ Fyzikálnej povahy, ako UV žiarenie, červené svetlo [22], teplota, mechanické poranenia [17], vysoký hydrostatický tlak [23], pulzné elektrické pole [24], mechanické vibrácie. [25]
- ❖ Chemickej povahy, ako soli ťažkých kovov, hyperosmotické pôsobenie, herbicídy, fungicídy. [17]

Zaujímavým príkladom abiotickej elicítácie je pôsobenie červeného svetla na obsah podofylotoxínu v bunkovej kultúre *Linum album*. [22]

### 3.2.1.2 Biotické elicitory

Biotické elicitory pochádzajú z mikrobiálnych alebo rastlinných zdrojov. [20]

**Exogénne biotické elicitory** zahrňujú zlúčeniny uvoľňované mikroorganizmami a inými patogénmi alebo tvorené pôsobením rastlinných enzýmov na mikrobiálne bunkové steny. Patria medzi ne napríklad: mikrobiálne enzýmy, hubové a bakteriálne lyzáty, kvasinkové extrakty a polysacharidy z bunkových stien mikroorganizmov – chitín, glukány. [1]

**Endogénne biotické elicitory** patria medzi ne polysacharidy vznikajúce z patogénnej degradácie rastlinnej bunkovej steny, intracelulárne proteíny a malé molekuly syntetizované rastlinnou bunkou (rastlinné hormóny - salicylová kyselina alebo metyljasmonát) ako odpoveď na rôzne typy stresu alebo patogénnych útokov. [1]

### 3.2.2 Faktory ovplyvňujúce elicítáciu

- ❖ Výber elicitoru – závisí na sekundárnom metabolite, ktorý je predmetom záujmu a na fyziologickom stave rastlinnej kultúry. [18] Príkladom závislosti na fyziologickom stave je zvýšenie produkcie fenyylpropanoidov v bunkovej suspenznej kultúre *Hypericum perforatum* v reakcii na podanie salicylovej kyseliny, zatiaľ čo kalus alebo kultivácia výhonkov *Hypericum perforatum* nevykazovala žiadnu významnú odozvu. [26]
- ❖ Koncentrácia elicitoru - elicitory môžu v relatívne vysokých koncentráciách spôsobiť stratu životaschopnosti buniek. Po elicítácii dôjde k spomaleniu rastu v *in vitro* kultúrach. Elicitor potláča primárny metabolizmus a smeruje metabolický tok k produkcii sekundárnych metabolitov v rastlinných kultúrach.
- ❖ Doba pridania elicitoru – bunky v rôznych rastových fázach reagujú odlišne na elicítáciu, pretože v rôznych štádiách rastu a bunkovom cykle majú rôzne hladiny mRNA, a proteínov.
- ❖ Dĺžka pôsobenia elicitoru – ovplyvňuje významne množstvo sekundárnych metabolitov v rastline. Konkrétny vplyv dĺžky pôsobenia a produkcie sekundárnych metabolitov závisí od druhu rastliny. [18]

Medzi ďalšie faktory ktoré ovplyvňujú elicitáciu patrí: vek kultúry, zloženie média a ďalšie. [17]

### 3.2.3 Mechanizmus elicitácie

Rozpoznávame niekoľko signálnych dráh, cez ktoré je možné vyvolať produkciu sekundárnych metabolitov. [1]

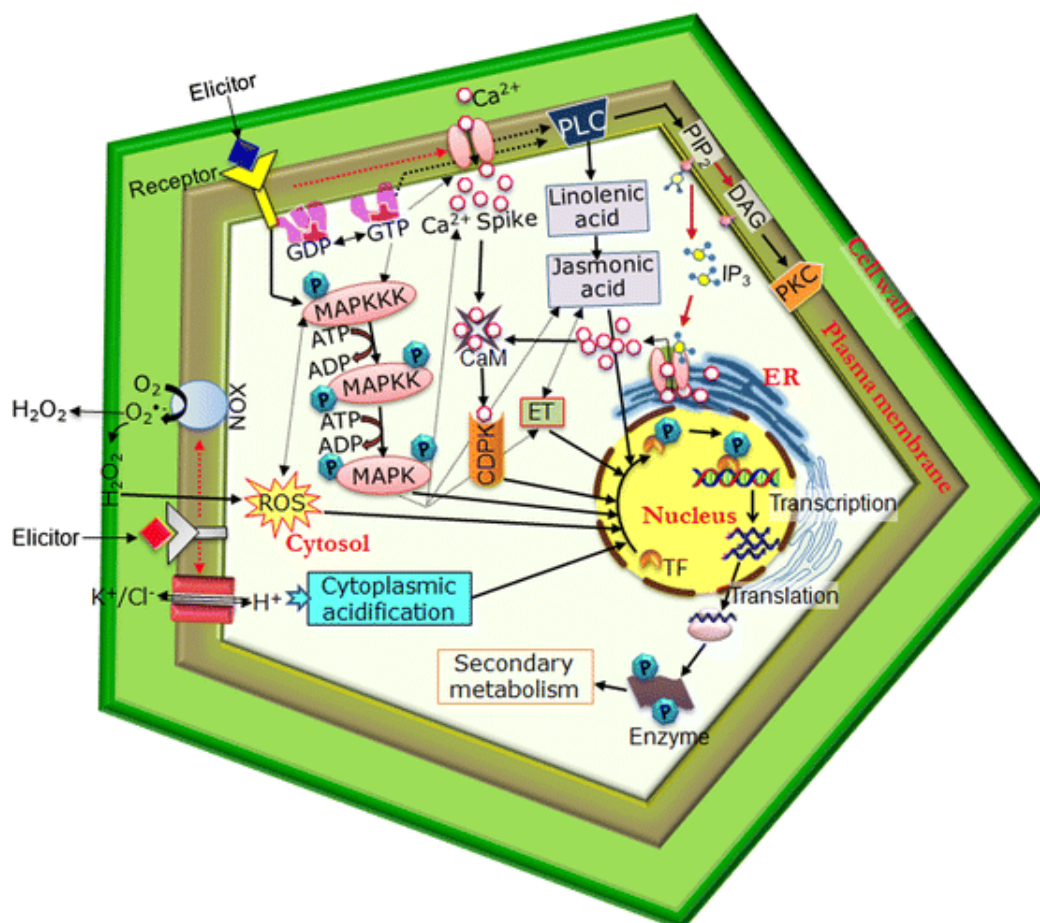
Elicitory sa naviažu na špecifické receptory v plazmatickej membráne. Výsledkom toho je depolarizácia, ktorá vedie k aktivácii membránových kanálov typu  $K^+/H^+$  antiportných kanálov. V dôsledku prechodu  $H^+$  iónov do vnútra bunky a efluxu  $Cl^-$  iónov z bunky je extracelulárne prostredie zásadité a intracelulárne prostredie kyslé. Kyslé prostredie v cytoplazme je signálom k produkcii sekundárnych metabolitov. [1]

Pri naviazaní elicitoru na receptor môže dochádzať k aktivácii na receptor naviazaného G proteínu alebo k aktivácii mitogénom aktivovanej proteinkinázovej kaskáde (MAPK-kaskáde). [18]

Ďalšia cesta zahŕňa elicitorom aktivovaný influx  $Ca^{2+}$ , čo má samo o sebe za následok aktiváciu mnohých intracelulárnych procesov.  $Ca^{2+}$  ióny sa viažu na senzory, ako je kalmodulín a stimulujú  $Ca^{2+}$  dependentné proteinkinázy, membránové enzýmy a proteínové fosfatázy, ktoré hrajú významné úlohy pri obrannej reakcii vrátane produkcie sekundárnych metabolitov. [18]

Receptory zviazané s G proteínmi môžu tiež aktivovať fosfolipázu C. Fosfolipáza C hydrolyzuje membránové fosfolipidy, ako je fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát. To vedie k produkcii sekundárnych poslov diacylglycerolu a inozitol-1,4,5-trisfosfátu. Diacylglycerol aktivuje proteín kinázu C a tým spúšťa niekoľko biochemických kaskád. Inozitol-1,4,5-trisfosfát vyvoláva prestup vápenatých iónov cez vápenaté iónové kanály bunkových organel, ako je endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a vakuoly do cytosolu. Uvádza sa, že vápenaté ióny taktiež regulujú fosfolipázu C, ktorá ako je známe produkuje sekundárnych poslov vrátane jasmonátu. Ďalej sa vie, že  $Ca^{2+}$  ióny aktivujú bunkové membránové NADPH oxidázy, apoplastickú peroxidázu alebo ďalšie oxidázy v chloroplastoch, mitochondriách, peroxizómoch a vytvárajú voľné kyslíkové radikály. Všetky tieto signálne dráhy vedú nakoniec k aktivácií de novo syntézy transkripčných faktorov, ktoré regulujú expresiu

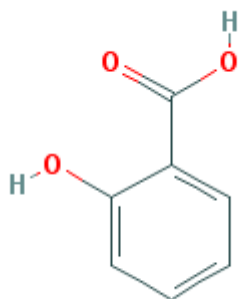
obranných génov kódujúcich enzýmy zastúpené v biosyntéze sekundárnych metabolitov. Veľmi časté je vzájomné ovplyvňovanie jednotlivých biochemických dráh. Často sa takto môžu ovplyvňovať signálne dráhy medzi jasmónovou kyselinou a etylénom a medzi transkripčnými faktormi ako sú napríklad ORA59, CEJ1, ERF1. Obdobne hrajú MAPK-kaskády úlohy v signálnych dráhach etylénu, jasmónovej kyseliny a mnohých ďalších. [18]



Obr.č.1. Schematické zobrazenie elicitorom ovplyvniteľných signálnych dráh [18]

(NOX-NADPH oxidáza, MAPK-mitogénom aktivovaná proteín kináza, ROS-reaktívne formy kyslíka, CaM-kalmodulín, CDPK-kalmodulín dependentná proteín kináza, ET-etylén, PLC-fosfolipáza C, PIP<sub>2</sub>-fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, DAG-diacylglycerol, PKC-proteín kináza C, IP<sub>3</sub>- inozitol-1,4,5-trisfosfát)

### 3.3 Salicylová kyselina



Obr.č.2. Salicylová kyselina [27]

Kyselina salicylová je monokarboxylová organická kyselina rastlinného pôvodu. Jedná sa o zlúčeninu prirodzene sa vyskytujúcu v rade rastlín, ktorá je známa svojím vplyvom na veľké množstvo rastlinných fyziologických procesov. [28]

Kyselina salicylová môže byť bežne prítomná ako obsahová látka v rôznych druhoch rodu *Salix* a *Populus*. [28]

Drogy vo forme čajových zmesí sú používané ako antireumatikum a antipyretikum. [28]

Produktivitu rastlinných buniek je možné zvýšiť pomocou elicitorov, ako sú kyselina salicylová a jasmónová, ktoré aktivujú expresiu génov kódujúcich enzýmy. Tieto enzýmy sa účastnia biosyntézy sekundárnych metabolitov. [29]

Rastliny syntetizujú salicylovú kyselinu premenou fenylalanínu na kyselinu trans-škoricovú. Táto premena je katalyzovaná enzýmom fenylalanínamóniumlyázou (PAL). PAL je kľúčovým regulátorom fenylpropanoidovej dráhy a je indukovaný na základe rôznych biotických a abiotických podmienok. Z kyseliny škoricovej môže byť salicylová kyselina tvorená cez kyselinu benzoovú alebo kyselinu o-kumarovú, v závislosti na tom, či hydroxylácia aromatického kruhu prebieha pred, alebo po reakciách skrátenia reťazca. Ďalšia cesta syntézy kyseliny salicylovej môže viesť cez kyselinu chorizmovú, ktorá je premenená izochorizmát syntázou (ICS) na kyselinu izochorizmovú. Bol zistený gén SID2 (ICS1), ktorý kóduje izochorizmát syntázu. SID2 gén má dva transkripčné faktory CBP60g (kalmodulín viažuci proteín) a SARD1 (systemic acquired resistance deficient). Sú schopné sa viazať na promotor génu SID2. Na zmeny množstva vápnika v cytosole reaguje CBP60g väzbou na kalmodulín. SARD1 na tieto zmeny nereaguje. Predpokladá sa, že CBP60g pôsobí na

zvyšovanie syntézy kyseliny salicylovej v rannej fáze spojenej so zvýšenou koncentráciou  $\text{Ca}^{2+}$  a SARD1 v neskoršej fáze, keď klesne množstvo  $\text{Ca}^{2+}$ . Problémom však ostáva, že zatiaľ neboli zistené enzýmy, ktoré konvertujú izochorizmat na salicylovú kyselinu. Presný mechanizmus syntézy salicylovej kyseliny v rastlinách nebol ešte objasnený. [30,31]

Salicylová kyselina je malá molekula, ktorá hrá dôležitú úlohu v procesoch ako je regulácia rastu, vývoja a reakcie na biotické stresy, ako signálna molekula pri aklimatizačných mechanizmoch a v regulačných systémoch obrany rastlín. Je známa tým, že indukuje systémovo získanú rezistenciu (SAR) na mnoho patogénov. Je možné ju teda zahrnúť medzi biotické elicitory. [1,32]

Behom interakcie medzi rastlinami a patogénmi spúšťa rýchlá akumulácia kyseliny salicylovej v mieste infekcie hypersenzitívnu reakciu. Signál sa potom rozširuje na ďalšie časti rastliny. Dochádza k vyvolaniu širokej škály obranných odpovedí vrátane výroby sekundárnych metabolitov. [1,32]

Exogénna aplikácia kyseliny salicylovej vedie ku aktivácii expresie rastlinných génov, ktoré súvisia s patogenézou a indukuje odolnosť voči ochoreniu. V odolných rastlinách tabaku infekcia vírom tabakovej mozaiky spúšťa zvyšovanie hladín salicylovej kyseliny nielen v spodných infikovaných listoch, kde sa tvorí hypersenzitívna odpoveď, ale aj v horných listoch, kde sa vyvíja SAR. Hypersenzitívna odpoveď je bežne aktivovaný proces vyvolaný rozpoznávaním faktorov odvodených od patogénu (PDF). Je charakterizovaná rýchlou indukciou smrti lokalizovaných buniek hostiteľa. Z buniek, ktoré poskytujú hypersenzitívnu odpoveď sú uvoľňované signály na základe ktorých je rastlinou indukovaná lokálne získaná rezistencia (LAR). [33]

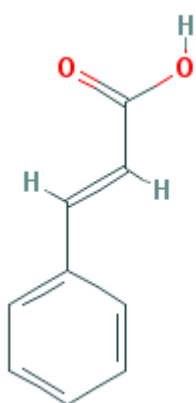
Zvýšená hladina kyseliny salicylovej v tkanivách vystavených patogénu vedie k indukcii génov závislých na patogéne (PR gény). Tieto gény sú rôznorodou skupinou, ktorá kóduje niekoľko proteínov s antimikrobiálnou aktivitou, a tým zvyšuje odolnosť rastliny voči širokému spektru patogénov. Jedným z kľúčových regulačných prvkov na kyseline salicylovej závislej aktivácii PR génov je NON-experesorový PR gén 1 (NPR1). Je známe, že kyselina salicylová reguluje deoligomerizáciu NPR1 do svojich aktívnych foriem. Aktívne formy sú lokalizované v jadre a interagujú s TGA triedou transkripčných faktorov bZIP, čo zase uľahčuje

expersiu PR génov a následnú obrannú reakciu. Gény NPR1 nielen riadia nástup SAR, ale taktiež ovplyvňujú LAR, schopnosť rastlín obmedzovať šírenie virulentných patogénov. Na patogén sa nevyvíja iba jedna odozva, ale existuje viacero signálnych dráh. Medzi jednotlivými signálnymi dráhami je prepojenie. Ako príklad môžeme uviesť signálnu dráhu kyseliny salicylovej a jasmónovej. Ich dráhy sa prelínajú a pôsobia vzájomne antagonisticky. Štúdie ukázali, že NPR1 je kľúčovou substanciou v antagonistickom pôsobení salicylovej kyseliny na jasmónovú kyselinu. U mutantných NPR1 rastlín bola zrušená kyselinou salicylovou podporovaná supresia génov jasmónovej kyseliny. Zaujímavý je fakt, že synergizmus bol zaznamenaný pri nízkych koncentráciách salicylovej a jasmónovej kyseliny. [34,35]

Významná úloha salicylovej kyseliny pri obranných mechanizmoch bola dokázaná na transgénnych NahG rastlinách tabaku. Obsahujú bakteriálny gén kódujúci salicylát-hydroxylázu, ktorý rozkladá salicylovú kyselinu. Rastliny si nie sú schopné nahromadiť dostatočné množstvo kyseliny salicylovej, tým pádom si ani vytvoriť odolnosť k víru tabakovej mozaiky. [30]

Salicylová kyselina nielenže indukuje priame ochranné mechanizmy, ale môže spôsobiť oxidačný stres v rastlinách prostredníctvom generovania reaktívnych foriem kyslíka, a tak sa účastní vývoja symptómov stresu. [36]

### 3.4 Škoricová kyselina



Obr.č.3. Škoricová kyselina [37]

Je alfa beta nenasýtená kyselina. Je to aromatická fenolová zlúčenina, ktorá je dôležitá pre rast a vývoj rastlín. Dáva škoricovým olejom charakteristický zápach a chuť. Je tiež známa pod názvom ako kyselina fenylakrylová. Kyselina škoricová



má antimikróbne účinky. Je to typický fenol, ktorý zabíja mikroorganizmy ovplyvnením membránovej permeability a interferuje s funkciou enzýmov. Biosyntéza kyseliny škoricovej cez fenylalanín je popísaná v kapitole 3.6.5.

Medzi deriváty škoricovej kyseliny patria jej metoxylové deriváty – kyselina ferulová, sinapová a hydroxylové deriváty – kyselina p-kumarová, kávová. Z kyseliny sinapovej vzniká kyselina trimetoxyškoricová. Avšak tieto kyseliny sa zriedka nachádzajú vo voľnej forme a sú esterifikované kyselinou vínnou, chinovou alebo viazané na cukry. Deriváty s fenolickou hydroxylovou skupinou majú antioxidantné, antibakteriálne a antivírusové vlastnosti. Antioxidantná aktivita je výrazne zvýšená zavedením druhej hydroxylovej skupiny (kávová kyselina) a metoxy substituentov do orto polohy. Tieto kyseliny sú používané v odvetví potravinárstva, parfumov, syntetických farbív a liečiv. [38,39,40]

Redukciou karboxylovej skupiny kyseliny škoricovej vznikajú prírodné látky, ktoré majú uhlíkový reťazec na aromatickom kruhu. Charakter reťazca môže byť buď alylový ako pri metylchavikole, safrole, myristicíne a apiole alebo 2-propylénový ako pri anetole, eugenole,  $\beta$ -azaróne, a fenikulíne. V niektorých prípadoch sa môžu spoločne v rastline nachádzať propylénové i alylové izoméry. Mnohé z nich sú zložkou silíc (*Oleum cinnamoni*, *Oleum foeniculi*, *Oleum petroselinii*) a balzamov. [38, 39, 40]

Kyselina škoricová sa môže uvoľniť z koreňa *Solanum melongena* a ostať v pôde aj po odstránení koreňov. Vysoká koncentrácia kyseliny škoricovej môže vyvolať autotoxicitu, a tým pádom zvýšenú náchylnosť k infekciám spôsobujúcich ochorenia. Pri koncentrácii 5 mg.l<sup>-1</sup> sa zvýšila výška rastlín *Majorana hortensis* a pri 10 mg.l<sup>-1</sup> sa výrazne zvýšilo percento oleja, celkový výnos oleja a obsah cukru v rastline. Nižšie koncentrácie zvyšujú aktivitu nitrátovej reduktázy *in vivo* a celkový obsah proteínov. Vyššia koncentrácia sa ukázala ako inhibičná. [39]

### **3.5 Borievka virgínska**

*Juniperus virginiana* L., - český názov Jalovec virgínský [41]

Synonymá najčastejšie používané v anglickom jazyku: Eastern redcedar, red alebo eastern juniper. [42]

### Taxonomické zaradenie:

❖ Ríša	<i>Plantae</i>	Rastliny
❖ Podríša	<i>Tracheobionta</i>	Cievnaté rastliny
❖ Oddelenie	<i>Pinophyta</i>	Nahosemenné
❖ Trieda	<i>Pinopsida</i>	Ihličnany
❖ Rad	<i>Pinales</i>	Borovicotvaré
❖ Čeľaď	<i>Cyprussaceae</i>	Cyprusovité
❖ Rod	<i>Juniperus</i>	Borievka
❖ Druh	<i>Juniperus virginiana</i>	Borievka virgínska [43]

Ide o pôvodný druh rozšírený vo východnej časti Severnej Ameriky od Kanady až po Floridu. Je obzvlášť dobre prispôsobený suchým oblastiam. Odolnosť voči ohňu je však malá. Množí sa aj pomocou rezov. [41, 44]

*Juniperus virginiana* je alternatívnym hosťom hrdze, hubového ochorenia, ktoré môže pôsobiť nepriaznivo na jablňové sady. [45]

Hoci je *Juniperus virginiana* jedným z najrozšírejších ihličnatých stromov v Spojených štátoch, pôvodne sa nevyskytoval na hranici prémie, pretože jeho populácia bola znižovaná ohňom. Dnes je zaznamenané jeho zvýšené množstvo práve v dôsledku potlačania ohňa a úbytku veľkých kopytníkov. Štúdií vplyvu *Juniperus virginiana* na prostredie je venované značné množstvo úsilia. [46]

Existuje veľké množstvo variet, ktoré sa odlišujú zafarbením, tvarom a ďalšími vlastnosťami. Prevažne je to dvojdomý strom s kužeľovitou korunou. Samčie stromy majú menej ohybné vetvy, sú tuhšie a v zime majú listy červenohnedú farbu, zatiaľ čo samičie sú celoročne zelené. Môže dosahovať až 30 m. U nás okolo 10m-20m. V oblastiach s nepriaznivými rastovými podmienkami dorastá do menšej výšky. [41, 44, 47, 48, 49]



Obr.č.4. *Juniperus virginiana* Botanická záhrada UPJŠ v Košiciach

(človek mierka 160 cm, odhadovaná výška *Juniperus virginiana* asi 10 m)

Koreňový systém je hlbší a rozvetvuje sa. Kôra je červenohnedá, hnedá až šedá. Jadrové drevo stromu má červenú farbu, okolo neho sa nachádza bielo-šedé drevo svetlejšej farby. Má štvorhranné veľmi tenké vetvičky. Táto drevina má dva typy listov. Krížmostojné šupinovité staršie listy, ktoré sú 2 mm dlhé, na konci prišpicaté odstupujúce od vetvičky a majú ryhovitú žľazku. Ihlicovité mladšie listy sú špicaté, dlhé 5-10 mm, na vrchnej strane s dvoma bielymi prúžkami a s jedným živicovým kanálkom. Mladšie listy môžu pretrvávajúť aj niekoľko rokov a môžu sa vyskytovať spoločne so staršími listami. [41, 44, 47, 48, 49]



Obr.č.5. *Juniperus virginiana* vetvička Botanická záhrada UPJŠ v Košiciach

Samičie šištice obsahujú jedno vajíčko na jednej šupine. Iba tri horné šupiny nesú vajíčko. Sú zložené z niekoľkých práslenov semenných šupín. Dochádza k zdužinataniu a zrastaniu šupín v šišku-nepravý plod, nazývaný aj galbulus. Galbuly sú vajcovité, s obsahom jedného až troch semien, väčšinou tmavo modrých zriedkavo šedých. Dozrievajú už v prvom alebo druhom roku. [41, 44, 47, 48, 49]

*Juniperus virginiana* 'Glauca' – stĺpovitý, rýchlo a bujne rastúci, 5 až 10 m vysoký. Typická je pre neho oceľovomodrá farba listov. Listy sú šupinkovité, malé, niekedy aj ihlicovité vo vnútri rastliny. [50]

*Juniperus virginiana* 'Hetzii' – je košatý ker so vzostupným vetvením. Môže dorásť do výšky 3,7 m až 4,6 m, ale častejšie má 1,5 m až 3 m. Listy sú modrozelené až šedozele. [51]

### 3.5.1 Použitie

Listy *Juniperus virginiana* môžu byť použité pre extrakciu podofylotoxínu ako alternatívny zdroj. [52]

Drevo sa používalo na výrobu ceruziek, nábytku, obkladov. Jadrové drevo je veľmi odolné proti termitom a hmyzu. Slúžilo k destilácii takzvaného cédrového oleja, ktorý sa používal v kozmetike. Olej, ktorý je obsiahnutý v dreve sa veľmi dlho používal v širokom sortimente výrobkov kvôli svojim antibakteriálnym, antifungálnym a antitermitickým vlastnostiam. Má aj schopnosť odpudzovať mole.

V záhradách a parkoch je veľmi často vysádzaný ako okrasná drevina. V dôsledku hustého množstva listov, môže byť použitý aj ako vetrolam. [41, 42, 48, 53, 54]

Galbuly sa používajú aj v potravinárstve do lekvárov, ako zložky korenia, do piva a ginu. [55]

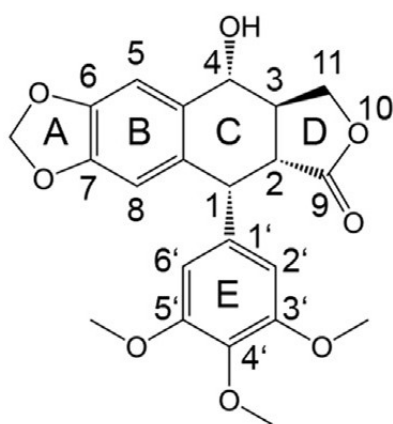
### 3.5.2 Obsahové látky

Jadrové, bieloé drevo, kôra a listy boli skúšané na obsah podofylotoxínu. Zistilo sa, že iba listy obsahujú podofylotoxín. Okrem toho ešte obsahujú aj silicu, ktorá je prítomná aj v dreve. Hlavnými zložkami silice v listoch sú: (-)- $\beta$ -pinén, limonén, (-)-linalol, myrcén, safrol a bornylacetát. V odlišných varietách sú ich zastúpenia rôzne. Jadrové drevo obsahuje v porovnaní s bieloým oveľa viacej silice. Staršie stromy v porovnaní s mladšími obsahujú v jadrovom dreve viacej silice. Hlavnými zložkami silice v dreve boli: cedrol, vidrol, thujopsen,  $\beta$ -cedren,  $\alpha$ -cedren. [52, 53, 56]

Nepравé bobule obsahujú silice: (cineol, myrcén, kamfen, terpineol), sacharidy, askorbovú kyselinu, organické kyseliny, triesloviny, flavonoidy, vitamíny, minerály a živicu. [55]

## 3.6 Podofylotoxín

### 3.6.1 Chemická štruktúra podofylotoxínu



Obr.č.6. Podofylotoxín [57]

Podofylotoxín je lignan. Lignany sa delia do ôsmich podskupín založených na spôsobe, akým je kyslík začlenený do kostry a cyklizačného vzoru. Podofylotoxín je teda presnejšie aryltetralin laktón. [58]

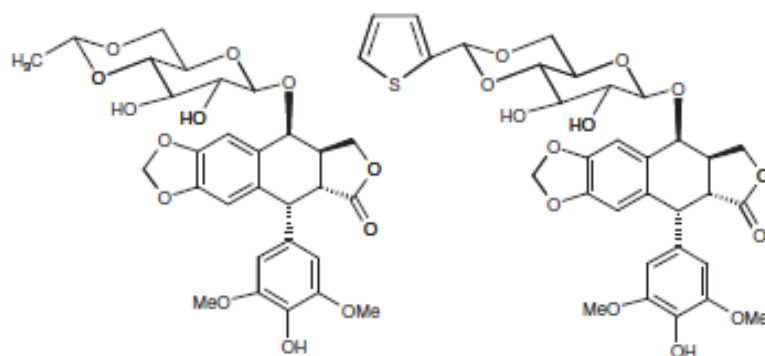
Molekula podofylotoxínu sa skladá z dioxolánového kruhu A, tetrahydronaftalénového (tetralínového) kruhu B a C a laktónového kruhu D. Na prvý uhlík C kruhu je pripojený trimetoxifynylový kruh E. Má 4 chirálne centrá v polohe C 1-4. Pre biologickú aktivitu má rozhodujúci význam konfigurácia 1,2-cis a 2,3-trans. Ak je hydroxylová skupina v polohe  $\beta$  je to podofylotoxín, ak  $\alpha$ , tak sa jedná o epipodofylotoxín. [57, 59]

Zo vzťahu medzi štruktúrou a účinkom je známe, že substitúcia v polohe 10 kruhu D spôsobila stratu aktivity, ktorá je úmerná veľkosti inkorporovaného substituentu ( $\text{SO}_2 > \text{S} > \text{O}$ ). Deriváty so sulfónovou skupinou sú úplne bez aktivity. Zavedenie objemného substituentu do polohy C-4 a C-11, alebo 4'-polohy kyslíku spôsobí taktiež stratu aktivity. [57]

Chemická syntéza podofylotoxínu je komplikovaná a zložitá kvôli prítomnosti štyroch chirálnych centier, rigídneho trans- $\gamma$ -laktónu, a axiálne prítomnému 1-aryl substituentu. [60]

Otvorenie laktónového kruhu v molekule podofylotoxínu má za následok vznik turiferovej kyseliny, čo zlepšuje protizápalové vlastnosti, a znižuje cytotoxicitu. [61]

Štúdiom vzťahov medzi štruktúrou a účinkom boli vytvorené semi-syntetické deriváty podofylotoxínu (etopozid, tenipozid) s dobrou aktivitou a s obmedzenými nežiaducimi účinkami. Nižšia toxicita, ale aj ich znížená cytostatická aktivita súvisí s tým, že glykozidy sú menej hydrofóbne. Tieto zlúčeniny vznikli demetyláciou v polohe 4', epimerizáciou C-4 a ich hydroxylová skupina v polohe 4 je súčasťou glykozidovej väzby s glukózou. Bez ohľadu na C-4 konfiguráciu východiskovej zlúčeniny (podofylotoxín, epipodofylotoxín) vzniká pri glykozilačnej reakcii C-4 $\beta$ -glykozid. Jedná sa teda o 4-glukopyranozylové deriváty epipodofylotoxínu, distereoizoméry podofylotoxínu. [59, 60, 62]

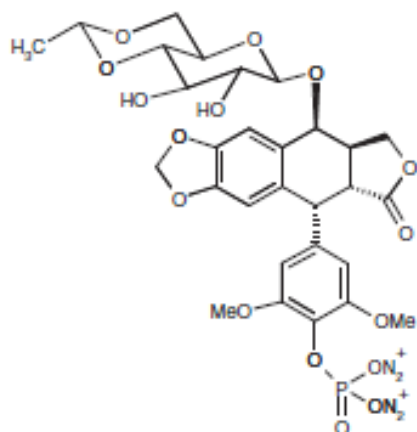


Obr.č.7. Štruktúra etopozidu (v ľavo) a tenipozidu [63]

Hlavná nevýhoda etopozidu je zlá rozpustnosť vo vode, ktorá môže spôsobiť alergickú reakciu a tiež sa vyžaduje použiť škodlivých rozpúšťadiel. Ďalší výskum priniesol vo vode rozpustné proliečivo etopozid fosfát (etopofos). V tomto prípade bola fosfátová skupina pridaná k voľnej hydroxylovej skupine fenolu, ktorá je ľahko odstrániteľná *in vivo* endogénnymi fosfatázami, čím uvoľňuje účinnú látku (etopozid) do obehového systému. [63]

Etopozid je prekursorom derivátu CPH 82. Je to zmes benzyldínových podofylotoxínových glykozidov. [62]

Ďalšie sľubné deriváty podofylotoxínu sú NK611, TOP 53, azatoxin a GL 311. [63]



Obr.č.8. Etopofos (etopozid fosfát) [63]

### 3.6.2 Farmakologická aktivita podofylotoxínu a jeho derivátov

Vzhľadom k svojej vysokej toxicite sa podofylotoxín používa v súčasnej dobe skôr ako lokálna antivírusová látka. Hlavne pri liečbe *Condyloma accuminatum* spôsobeného ľudským papilomavírom (HPV) a pri liečbe anogenitálnych bradavíc.

Pre svoju toxicitu sa podofylotoxín nepoužíva ako protirakovinová látka. Podofylotoxínu ako inhibítor mitózy môže byť použitý aj ako antimalarikum a antimykotikum. Je ho možné použiť aj pri *Molluscum contagiosum*. Zmes prírodných a polysyntetických glykozidov z *Podophyllum hexaendrum* sa dlho používal na liečbu reumatoidnej artritídy, ale vykazuje gastrointestinálne nežiaduce účinky. Semi-syntetické deriváty podofylotoxínu sú etopozid, etopofos a tenipozid. Zohrávajú dôležitú úlohu pri liečbe rakoviny. Etopozid sa terapeuticky využíva pri liečbe solídnych nádorov, ako rakovina prsníka, malobunkového karcinómu, karcinómu pľúc, testikulárnych nádorov, Kaposiho sarkómu a lymfómov. Tenipozid sa používa menej často a predovšetkým na liečbu lymfómov. Etopofos sa môže podávať intravenózne vo vyšších dávkach. GPH 82 sa testuje na reumatoidnú artritídu. V porovnaní s metotrexátom je menej účinný, ale bezpečnejší. [60, 63, 64, 65, 66]

### 3.6.3 Zdroje podofylotoxínu

Jedným z najčastejšie uvádzaných zdrojov podofylotoxínu je rod *Podophyllum*. Zvyčajne sa podofylotoxín extrahuje zo živice (podofylín) získanej z koreňov a podzemkov *Podophyllum hexandrum* (*P. emodi*), známy tiež ako indický druh, a *Podophyllum peltatum*, známy ako americký druh. Podofylová živica je amorfný prášok, svetlohnedej až žltej farby, keď je vystavený svetlu hnedne. Ide o zmes lignanov, ktorej hlavnou zložkou je podofylotoxín a ďalšími zložkami sú  $\alpha$  a  $\beta$ -peltatin, demetylpodofylotoxín a pikro-podofylotoxín. Tieto cenné rastlinné druhy sú získavane z Himaláji a zo Severnej Ameriky. Izolácia z *P. hexandrum* je výhodnejšia, pretože, jeho živica je svojím obsahom bohatšia na podofylotoxín. Dostupnosť podofylotoxínu izolovaného z tejto rastliny je limitovaná kvôli vzácnemu výskytu, intenzívnemu zberu a nedostatočne organizovanému pestovaniu ďalších rastlín. Hlavné problémy pri kultivácii sú dlhá juvenilná fáza a semenám trvá dlhý čas kým vyklíčia. *P. hexandrum* je kvôli nadmernej spotrebe uvedený v prílohe II k dohovoru o medzinárodnom obchodovaní s ohrozenými druhmi (CITES). Keďže výťažky podofylotoxínu sú nízke, je to celkom drahá východisková zlúčenina pre syntézu derivátov. Intenzívne sa hľadajú alternatívne zdroje podofylotoxínu, ďalšie metódy jeho výroby, ako technológia rastlinných buniek a tkanivových kultúr a vývoj kratších syntetických ciest. [60, 63, 64, 67]



Medzi ďalšie rody, ktoré môžu byť zdrojom podofylotoxínu a jeho derivátov patrí *Juniperus*, *Thuja*, *Callitris*, *Thujopsis* (*Cupressaceae*), *Polygala* (*Polygalaceae*), *Linum* (*Linaceae*), *Catharantus* (*Apocynaceae*) a ďalšie. Hoci rod *Juniperus* nemá, tak veľký obsah podofylotoxínu ako rod *Podophyllum*, tak ihlice *Juniperus virginiana* sa môžu využiť ako sľubný alternatívny zdroj. *Juniperus virginiana* sa považuje za invazívny druh a pestuje sa pre drevo, ktoré sa používa v drevárskom priemysle. Je teda možnosť získať veľké množstvo ihlíc ako vedľajší produkt. Je taktiež hospodársky a ekonomicky udržateľným zdrojom z dôvodu vyššej produkcie biomasy, širšieho rozdelenia, menej komplikovanej kultivačnej techniky, širšej prispôsobivosti a možnosti využitia počas celého roku. *Juniperus bermudiana* obsahuje väčšie množstvo podofylotoxínu ako *Juniperus virginiana*. Je však ohrozeným druhom, kvôli pôsobeniu patogénneho hmyzu. Existujú snahy o prekríženie s *Juniperus virginiana*. Zaujímavé je, že *Aspergillus fumigatus*, endofytická huba z *Juniperus communis* L. 'Horstmann', môže syntetizovať aryltetralín lignany, teda aj podofylotoxín. [53, 63, 64, 67]

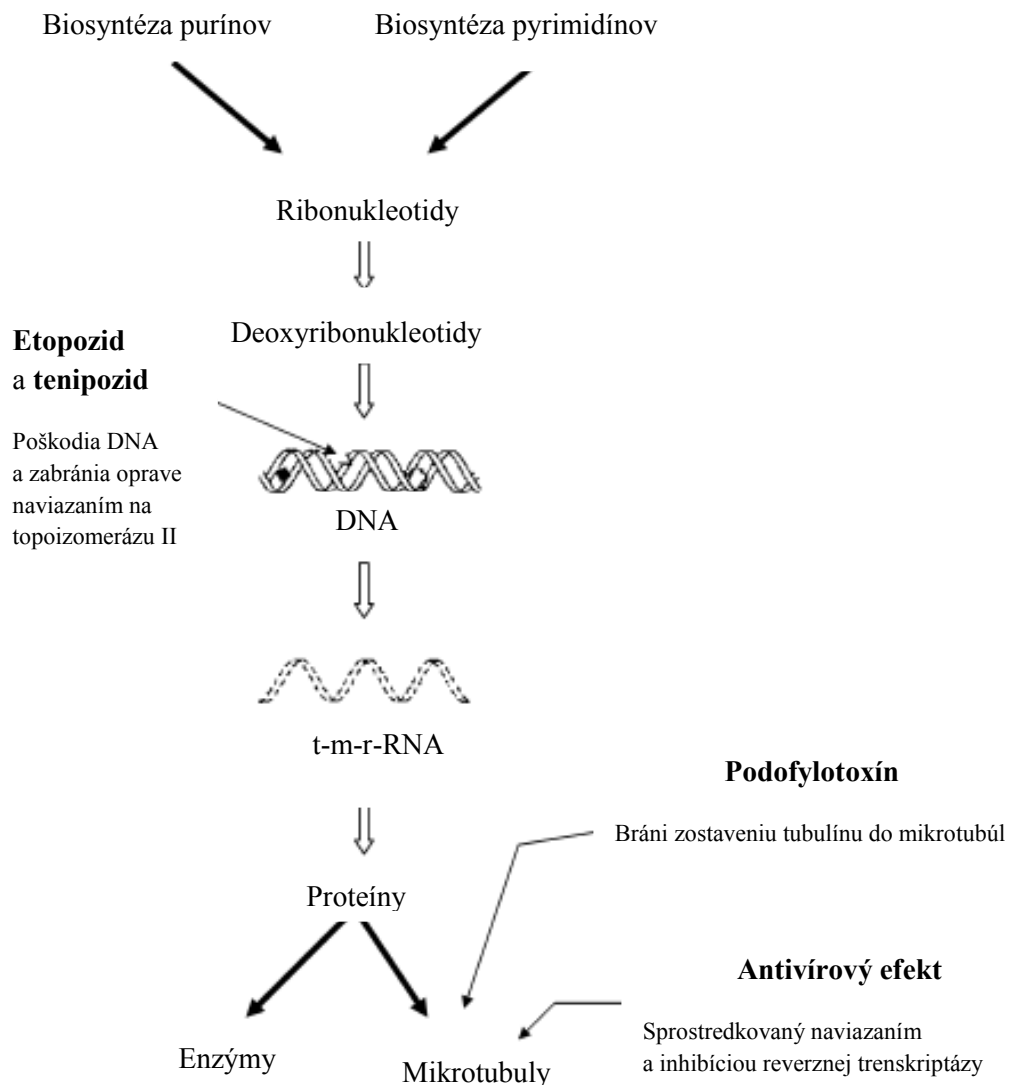
### 3.6.4 Mechanizmus účinku

Mikrotubuly sú atraktívny cieľ pre látky s protirakovinovou aktivitou. Sú to duté valce vyrobené z usporiadaných zostáv  $\alpha/\beta$ -tubulínových heterodimérov. Podofylotoxín má antineoplastické účinky, ktoré bránia zostaveniu tubulín do mikrotubúl a vedú k apoptóze. Tento účinok, môže byť dosiahnutý zabránením polymerácie tubulínu. Naviaže sa na  $\beta$ -podjednotku zakriveného tublínu a zabraňuje mu prijať rovnú (mikrotubulovú) štruktúru, ktorá je potrebná na zostavenie tubulínu. To môže indukovať zastavenie bunkového cyklu pri mitóze (M-fáze bunkového cyklu) a brániť tvorbe mikrotubúl mitotického vretienka. Výsledky predklinických štúdií potvrdili, že podofylotoxín zabraňuje polymerácii mikrotubúl, čo vedie k zastaveniu mitózy, ako ukazuje kumulácia proteínov súvisiacich s mitózou – BIR5C a aurora B. [57, 59, 60, 63, 64]

Zlúčeniny podobné etopozidu nie sú inhibítormi mikrotubúl, kvôli prítomnosti objemnej glukozidovej skupiny. Bolo zistené, že tieto látky môžu zastaviť bunku buď v neskorej S-fáze (replikácie DNA), alebo vo fáze G2 (fáza medzi posledným delením a začiatkom DNA replikácie) bunkového cyklu. Etopozid a tenipozid spôsobujú prerušenie jedného vlákna DNA. Taktiež pôsobia prostredníctvom

inhibície topoizomerázy II. Tá je schopná dočasne prerušiť obidve vlákna dvojzvitnice. Topoizomeráza II vytvára prechodnú, kovalentnú DNA-proteínovú väzbu, štiepateľný komplex, ktorý dovolí, aby jeden dvojitý reťazec DNA prešiel dočasne prerušeným ďalším dvojitým vláknom. Etopozid sa viaže a stabilizuje štiepateľný komplex a preto nedôjde k oprave porušeného reťazca. [57, 59, 60, 63, 64]

Syntetické analógy podofylotoxínu vykazujú aj antivírové účinky. Sú schopné inhibovať reverznú transkriptázu. Dochádza k selektívnemu potlačeniu RNA vírov, ako je napríklad HIV. [59]



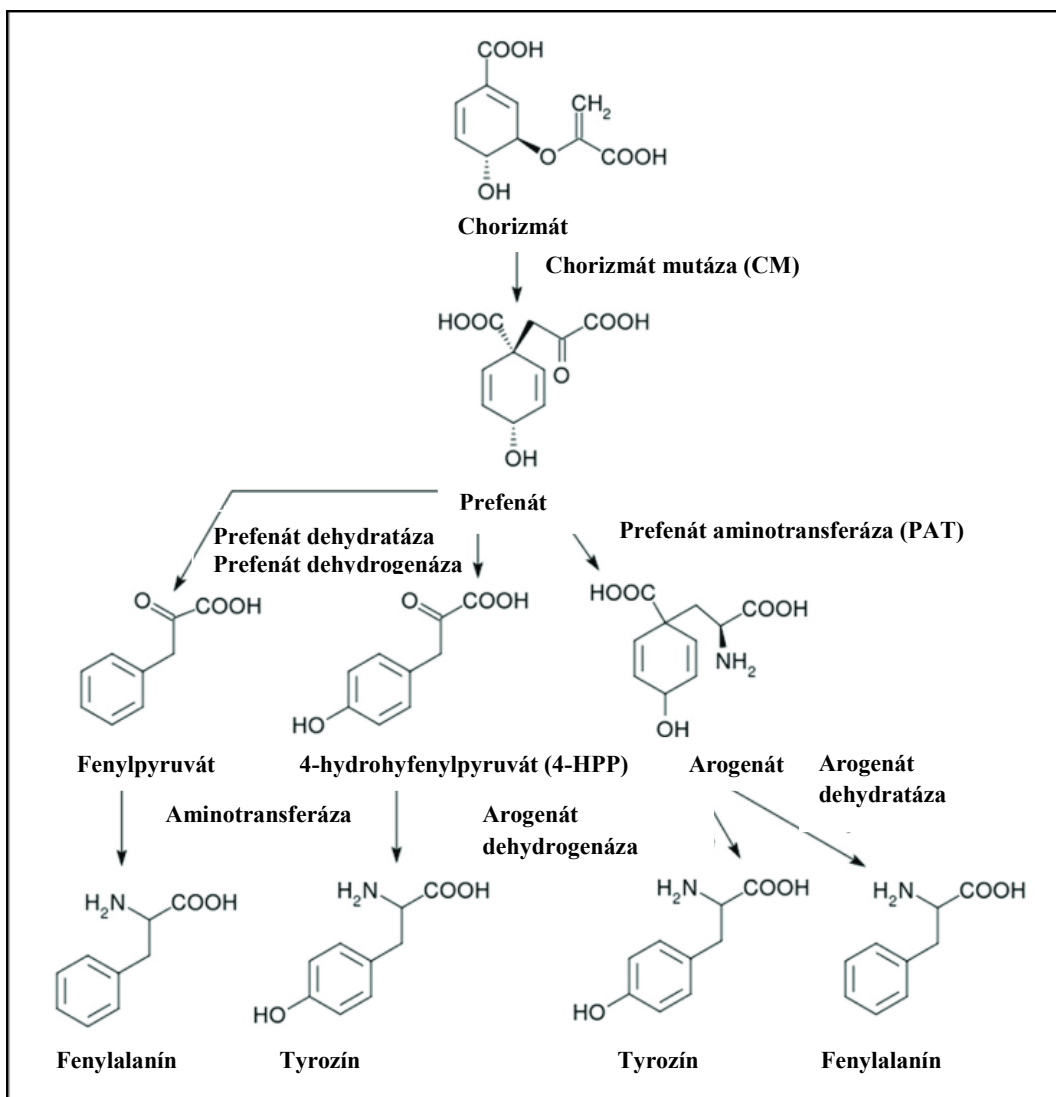
Obr.č.9. Mechanizmus účinku podofylotoxínu, etopozidu, tenipozidu a antivírový účinok. [62]

### 3.6.5 Syntéza vedúca k podofylotoxínu

V priebehu evolúcie si huby, baktérie a rastliny udržiavali mechanizmy potrebné na syntézu aromatických aminokyselín de novo. Aromatické aminokyseliny fenylalanín, tyrozín, tryptofán nie sú v rastlinách iba esenciálnymi zložkami, ale slúžia tiež ako prekurzory pre širokú škálu sekundárnych metabolitov. Syntetizujú sa šikimátovou cestou, ktorá vedie k vzniku chorizmátu. Je to bod, z ktorého vychádza jedna dráha pre vznik tryptofánu a ďalšia dráha pre vznik tyrozínu a fenylalanínu. Okrem toho sú biosyntetické dráhy aromatických aminokyselín potenciálnymi cieľmi antimikrobiálnych látok a rastlinných herbicídov. [68,69]

V rastlinách a mikroboch biosyntéza fenylalanínu a tyrozínu pochádza z chorizmátu. Ten je chorizmát mutázou (CM) premenený na prefenát, ktorý sa prefenát dehydrogenázou alebo prefenát dehydratázou dekarboxyluje buď na 4-hydroxyfenylpyruvát (4-HPP), z ktorého vznikne tyrozín, alebo fenylpyruvát, z ktorého vznikne fenylalanín. Aminotransferáza ďalej premieňa výsledné alfa-keto kyseliny (4-HPP alebo fenylpyruvát) na aminokyseliny (tyrozín a fenylalanín). [68, 69]

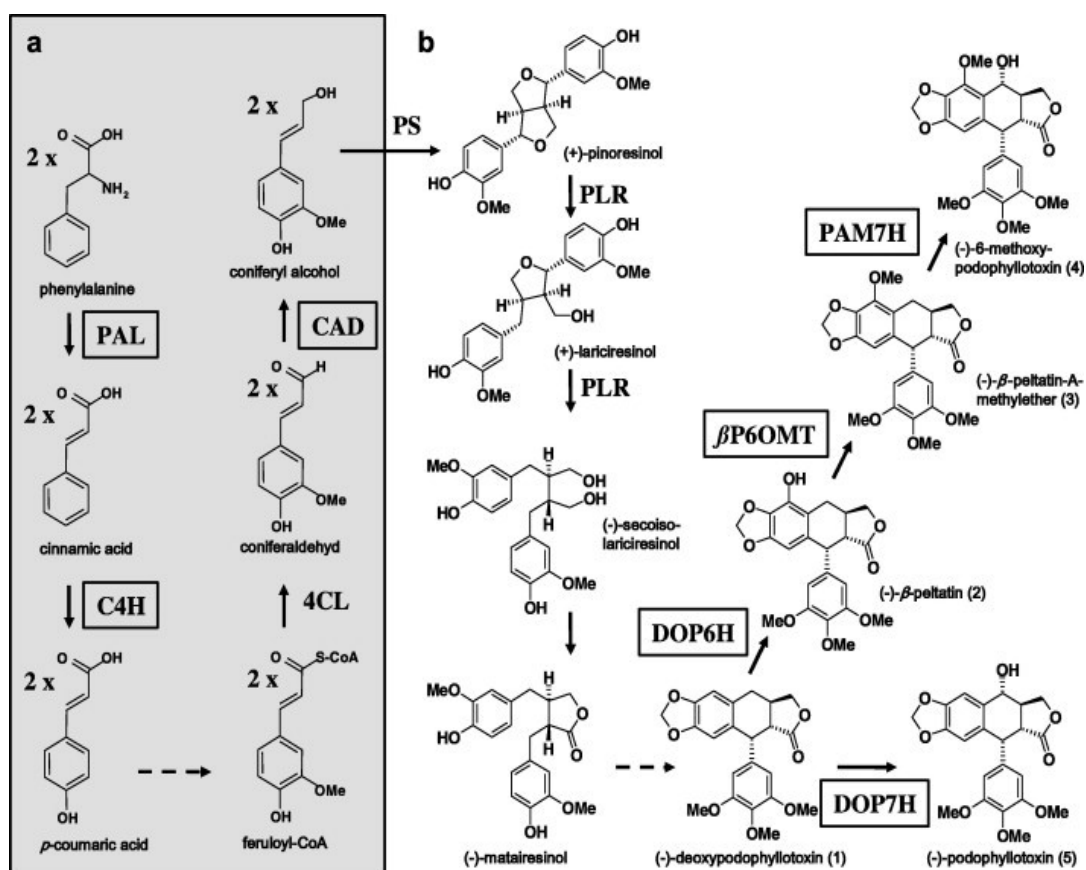
Hlavne rastliny a niektoré mikroby používajú aj alternatívnu cestu cez arogenát, aby si mohli nasyntetizovať tieto aminokyseliny. V tejto dráhe prefenát aminotransferáza (PAT) katalyzuje amináciu prefenátu na arogenát. Dekarboxylácia arogenátu cez arogenát dehydrogenázu alebo arogenát dehydratázu vedie buď k vzniku fenylalanínu, alebo tyrozínu. Hoci PAT aktivita bola detekovaná v rôznych rastlinách, gén, ktorý kóduje PAT bol objavený iba nedávno v *Arabidopsis* (AtPAT). [68, 69]



Obr.č.10. Syntéza fenylalanínu a tyrozínu [70]

Veľa rastlinných druhov využíva pre biosyntézu sekundárnych metabolitov fenylpropanoidnú dráhu. Na jej začiatku stojí fenylalanín. Dochádza k deaminácii fenylalanínu pomocou PAL. Tvorí sa fenylpropanoidný skelet, čím sa získa kyselina trans-škoricová. Zdá sa, že trans-škoricová kyselina inhibuje PAL a tým reguluje fenylpropanoidnú syntézu. Kvôli čiastočnej konverzii trans-škoricovej kyseliny jej derivátov a glukozidov pôsobením UV žiarenia na cis-izoméry dôjde k rýchlemu zvráteniu PAL inhibície. Z kyseliny trans-škoricovej katalýzou kyselinou škoricovou-4-hydroxylázou (C4H) dôjde k zavedeniu hydroxylovej skupiny do p-polohy fenylového kruhu. Výsledkom tejto reakcie je kyselina p-kumarová (p-hydroxyškoricová). Obsahuje karboxylovú skupinu, ktorá sa potom aktivuje vytvorením tioesterovej väzby s koenzýmom A. Tento krok syntézy je katalyzovaný p-kumaroyl CoA ligázou. (4CL). Celý tento proces vyústi k vzniku p-kumaroyl

CoA (koenzým A aktivovaný hydroxycinamoyl tioester). Z p-kumarátu môžu vznikáť kumaríny. Z p-kumaroyl-CoA flavonoidy a stilbény. P-kumaroyl-CoA alebo aj z p-kumarátu môžu vzniknúť lignany, ligníny. [39, 71]. Syntéza lignanov je zložitý proces, ktorý aj napriek dlhoročnému výskumu ešte nie je úplne objasnený. Hlbšiemu porozumeniu tejto syntézy nepomáha ani to, že jeden enzým v tejto dráhe môže katalyzovať viacero reakcií. [72]



Obr.č.11. Zjednodušená syntéza podofylotoxínu a 6-metoxypodofylotoxínu [73] (PAL-fenylalanínamóniumlyáza, C4H-kyselina škoricová-4-hydroxyláza, 4CL-p-kumaroyl CoA lygáza, CAD-škoricová alkohol-dehydrogenáza, PLR-pinorezinol-laricirezinol reduktáza, DOP6H-deoxypodofylotoxín-6- hydroxyláza, DOP7H-deoxypodofylotoxín-7- hydroxyláza, βP6OMT-β-peltatin-6-O-metyltransferáza, PAM7H-β-peltatin-A-metyléter-7- hydroxyláza)

Lignany sú odvodené z fenylpropanoidnej dráhy. Dve molekuly koniferyl alkoholu sa dimerizujú v prítomnosti jednoelektrónového oxidovadla-lakázy a riadiaceho proteínu, ktorý vedie k vytvoreniu stereošpecifického usporiadania (+)-pinorezinolu. Bez tohto proteínu, iba v prítomnosti lakázy by vznikol (±)-pinorezinol. Následne dochádza k selektívnej redukcii (+)-pinorezinolu cez (+)-laricirezinol na

(-)-sekoizolaricirezinol pomocou pinorezinol-raricirezinol reduktázy (PLR). Selektívnou oxidáciou (-)-sekoizolaricirezinolu pomocou sekoizolaricirezinol dehydrogenázy vzniká (-)-matairezinol. Možným medziproduktom medzi matairezinolom a podofylotoxínom môže byť yatein. [59, 58] Kroky, ktoré vedú od (-)-matairezinolu k deoxypodofylotoxínu nie sú ešte dobre preskúmané. Experimenty sa snažia objasniť aj, kroky vedúce od deoxypodofylotoxínu k podofylotoxínu a 6-metoxypodofylotoxínu (6MPTOX). K rastlinám *Podophyllum hexandrum* bol pridaný deoxypodofylotoxín a viedlo to k produkcii podofylotoxínu, čo naznačuje, že deoxypodofylotoxín je prekursorom podofylotoxínu. Deoxypodofylotoxín, ktorý bol pridaný k bunkovej kultúre *Linum flavum* bol premenený na 6MPTOX a jeho glukozid, zatiaľ čo podofylotoxín bol premenený iba na svoj glukozid. Podofylotoxín nie je prekursorom 6MPTOX. Z uvedeného vyplýva, že z deoxypodofylotoxínu môže dôjsť buď k syntéze podofylotoxínu (*Podophyllum hexandrum*) a to hydroxyláciou enzýmom deoxypodofylotoxín-7-hydroxylázou (DOP7H) alebo k vzniku 6MPTOX (*Linum flavum*), a to hydroxyláciou enzýmom cytochrómu P450, deoxypodofylotoxín-6-hydroxylázou (DOP6H), čím dôjde k vzniku  $\beta$ -peltatínu. Ten môže byť ďalšími reakciami premenený až na 6MPTOX. [73, 63]

Zaujímavé zistenia priniesli pokusy u *Linum album*. Naznačujú, že absencia DOP6H je kľúčovým faktorom pre vytvorenie podofylotoxínu namiesto 6MPTOX. Ak nie je vytvorená DOP6H, deoxypodofylotoxín môže byť akumulovaný namiesto (-)- $\beta$ -peltatin-A-metyléteri. V tomto prípade  $\beta$ -peltatin-A-metyléter-7-hydroxyláza (PAMH7) môže hydroxylovať deoxypodofylotoxín, namiesto  $\beta$ -peltatin-A-metyléteri, na podofylotoxín. To znamená, že hydroxylácia na  $\beta$ -peltatin-A-metyléter, vedúca k 6MPTOX alebo hydroxylácia deoxypodofylotoxínu vedúca k podofylotoxínu môže byť katalyzovaná rovnakým enzýmom a nie dvoma PAM7H a DOP7H. [73]

## 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Pomôcky a prístrojové vybavenie

Pri experimentoch boli použité nasledujúce prístroje:

- ❖ Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- ❖ Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- ❖ Box s laminárnym prúdením Fatran LF, Žilina
- ❖ Centrifúga MPW 342, Mechanika precyzyjna, Varšava
- ❖ Germicídna lampa UVR-Mi, BiosanLtd, Lotyšsko
- ❖ Horkovzdušný sterilizátor HS 31 A, Chirana, Brno
- ❖ Chromatografická sústava JASCO 2000-Plus, Jasco, Tokyo
- ❖ Mikrofiltre (0,20  $\mu\text{m}$ ), Corning NY 14831, Nemecko
- ❖ Trepačka VKS 75A, Edmund BuehlerGmbH, Hechingen
- ❖ Ultrazvukový kúpeľ RK 100H, BandelinelectronicGmbH, Berlín
- ❖ Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc ČR.

### 4.2 Chemikálie

- ❖ Ajatin plus roztok 10%, Profarma–produkt s.r.o., ČR
- ❖ Destilovaná voda, Katedra analytickej chémie, FaF UK v HK, ČR
- ❖ Dihydrogenfosforečnan amonný *p. a.*, Lachema, ČR
- ❖ Dusičnan draselný *p. a.*, Lachema, ČR
- ❖ Edetan sodný *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Etanol 96%, Lachema, ČR
- ❖ Chlorid kobaltnatý hexahdrát *p. a.*, Lachema, ČR
- ❖ Chlorid pyridoxínia *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Chlorid tiamínia *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Chlorid vápenatý dihydrát *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Jodid draselný *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Kinetín *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Kyselina askorbová *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Kyselina boritá *p. a.*, Lachema, ČR
- ❖ Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko

- ❖ Kyselina fosforečná *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Kyselina nikotinová *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Kyselina octová ľadová *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Kyselina salicylová, Sigma-Aldrich, Nemecko
- ❖ Kyselina škoricová, Sigma-Aldrich, Nemecko
- ❖ Metanol *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Molybdenan sodný dihydrát *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Myo-inozitol, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Sacharóza *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Síran horečnatý heptahydrát *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Síran manganatý monohydrát *p. a.*, Lachema, ČR
- ❖ Síran meďnatý pentahydrát *p. a.*, Lachema, ČR
- ❖ Síran zinočnatý heptahydrát *p. a.*, Penta, ČR
- ❖ Síran železnatý heptahydrát *p.a.*, Lachema, ČR
- ❖ Štandard pre HPLC analýzu - podofylotoxín, Sigma–Aldrich, Nemecko
- ❖ Tiamín *p. a.*, Sigma–Aldrich, Nemecko

### 4.3 Rastlinný materiál

V diplomovej práci boli k pokusom použité suspenzné kultúry *Juniperus virginiana* L., variety 'Glauca' a 'Hetzii'. U variety 'Glauca' bola pozorovaná produkcia podofylotoxínu v 2. a 6. pasáži. U variety 'Hetzii' bola pozorovaná produkcia podofylotoxínu v 8. pasáži.

### 4.4 Nástroje a kultivačné nádoby

Pri experimentoch bolo použité sklo značky SIAL, ktoré je žiaruvzdorné a dostatočne odolné voči chemikáliám. Pri práci s rastlinným materiálom boli použité kovové nástroje, ktoré boli opláchnuté 96% etanolom a sterilizované v hliníkovej fólii teplovzdušným sterilizátorom pri teplote 200°C po dobu 2 hodín.

### 4.5 Príprava kultivačného média.

Pre kultiváciu explantátovej kultúry *Juniperus virginiana* bolo použité živné médium podľa Schenka a Hildebrandta (SH), ktoré má takéto zloženie:



**Tabuľka 1.** Základné zloženie SH média

<b>Makroelementy</b> (množstvo substancie mg.l <sup>-1</sup> )	CaCl <sub>2</sub>	151,00 mg.l <sup>-1</sup>
	KNO <sub>3</sub>	2 500,00 mg.l <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	195,00 mg.l <sup>-1</sup>
	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300,00 mg.l <sup>-1</sup>
<b>Mikroelementy</b> (množstvo substancie mg.l <sup>-1</sup> )	CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,10 mg.l <sup>-1</sup>
	CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,20 mg.l <sup>-1</sup>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,00 mg.l <sup>-1</sup>
	KI	1,00 mg.l <sup>-1</sup>
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	10,00 mg.l <sup>-1</sup>
	NaFeEDTA	19,80 mg.l <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,10 mg.l <sup>-1</sup>
	ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1,00 mg.l <sup>-1</sup>
<b>Vitamíny</b> (množstvo substancie mg.l <sup>-1</sup> )	kyselina nikotínová	5,00 mg.l <sup>-1</sup>
	Myo-inositol	1000,00 mg.l <sup>-1</sup>
	pyridoxín chlorid	0,50 mg.l <sup>-1</sup>
	sacharóza	30 000,00 mg.l <sup>-1</sup>
	tiamín chlorid	5,00 mg.l <sup>-1</sup>

[74]

K živnému médiu boli pridané kyselina askorbová a rastové regulátory v koncentráciách: 15 mg.l<sup>-1</sup> kyselina askorbová, 3,0 mg.l<sup>-1</sup> kyselina  $\alpha$ -naftyloctová, 0,2 mg.l<sup>-1</sup> kinetín. [75]

Jednotlivé látky boli pre prípravu živného média odvážené na analytických váhach alebo pipetované z dopredu pripravených zásobných roztokov. Pipetovanie zo zásobných roztokov sa týkalo látok o nízkej koncentrácii. Látky boli rozpustené v odmernej banke a doplnené destilovanou vodou na objem 1 liter. Živné médium bolo preliate do Erlenmeyerových baniek bez vložených mostíkov (pre kultiváciu suspenzných kultúr) alebo s vloženými mostíkmi (pre kultiváciu kalusových kultúr). Mostíky boli z filtračného papiera. Takto upravené banky boli uzavreté pomocou hliníkovej fólie a sterilizované. Sterilizácia prebiehala v autokláve po dobu 15 minút, pri tlaku pary 0,1 MPa a teplote 121 °C.

#### **4.6 Pasážovanie a kultivácia suspenzných kultúr**

Suspenzné kultúry boli získané z rozpadavej štvorročnej kalusovej kultúry mechanickým roztrepaním na trepačke v Erlenmeyerovej banke so živným médiom. Pasážovanie kultúr bolo urobené odpipetovaním časti suspenzie, ktorá narástla (2 ml) do pripravených baniek s čerstvým médiom za aseptických podmienok v boxe s laminárnym prúdením vzduchu. Ten bol najprv sterilizovaný germicídny žiarením minimálne po dobu 1 hodiny. Pracovalo sa so sterilným sklom a nástrojmi. Nakoniec boli hrdlá baniek prekryté hliníkovou fóliou. Kultivácia prebiehala po dobu 14 dní na rotačnej trepačke (115 otáčok za minútu) v kultivačnej miestnosti pri teplote 25°C a svetelnej perióde 16 hodín svetlo a 8 hodín tma.

#### **4.7 Ovplyvnenie produkcie podofylotoxínu**

K suspenzným kultúram *Juniperus virginiana* varieta 'Glaucá' a 'Hetzii' boli pre zvýšenie produkcie podofylotoxínu pridávané kyselina škoricová – prekursor fenypropánového metabolizmu a kyselina salicylová – fytohormón, biotický elicitor.

K pokusom boli pripravené:

1) Štyri koncentrácie vodného roztoku kyseliny salicylovej

Koncentrácia I            0,01 mmol.l<sup>-1</sup>

Koncentrácia II           0,10 mmol.l<sup>-1</sup>

Koncentrácia III 1,00 mmol.l<sup>-1</sup>

Koncentrácia VI 10,0 mmol.l<sup>-1</sup>

2) štyri koncentrácie roztoku kyseliny škoricovej v 60% liehu

Koncentrácia I 0,10 mmol.l<sup>-1</sup>

Koncentrácia II 1,00 mmol.l<sup>-1</sup>

Koncentrácia III 10,0 mmol.l<sup>-1</sup>

Koncentrácia VI 100 mmol.l<sup>-1</sup>

## 4.8 Priebeh pokusov a odber kultúr

V 14. deň kultivácie boli za aseptických podmienok pridávané k suspenzným kultúram pripravené roztoky kyseliny salicylovej alebo kyseliny škoricovej. K experimentom bolo použitých 72 kultivačných baniek so suspenznou kultúrou. Súbor 8 neelicitovaných baniek slúžil ako kultúra kontrolná. Ku kontrolným kultúram bolo pridávané 1,0 ml destilovanej vody, resp. 1 ml 60% liehu. Do ostatných 64 baniek s kultúrou bol napipetovaný vždy 1,00 ml pripraveného roztoku elicitoru o príslušnej koncentrácii. Potom boli elicítované kultúry ďalej kultivované za už uvedených podmienok. Po 6, 24, 48 a 168 hod aplikácie roztoku boli ošetrované kultúry odobrané. Odbery kontrolných kultúr boli urobené po 6 a 168 hod. Bunky suspenznej kultúry boli oddelené od kultivačného média filtráciou za zníženého tlaku. Ďalej boli premyté destilovanou vodou a sušené za laboratórnej teploty. U každej vzorky bol stanovený obsah podofylotoxínu.

## 4.9 Stanovenie obsahu podofylotoxínu

### 4.9.1 Príprava vzorky

Na analytických váhach sa odvážilo asi 0,3000-0,5000 g usušenej a upráškovanej kultúry *Juniperus virginiana*. Navážená vzorka sa previedla do 10,0 ml odmernej banky a zmiešala sa s 10,0 ml metanolu. Pri laboratórnej teplote sa extrahovala ultrazvukom po dobu 1 hod. Extrakt sa previedol do centrifugačnej skúmavky a odstreduje sa 5 min pri 4 500 otáčkach. Supernatan sa previedol do označených vialiek cez mikrofilter. Vzorky vo vialkách sa ďalej analyzovali HPLC. Obsah

všetkých meraných látok bol kvantifikovaný matematickou metódou normalizácie a porovnaním s kalibračnou krivkou vytvorenou pomocou externe meraného štandardu tej istej látky.

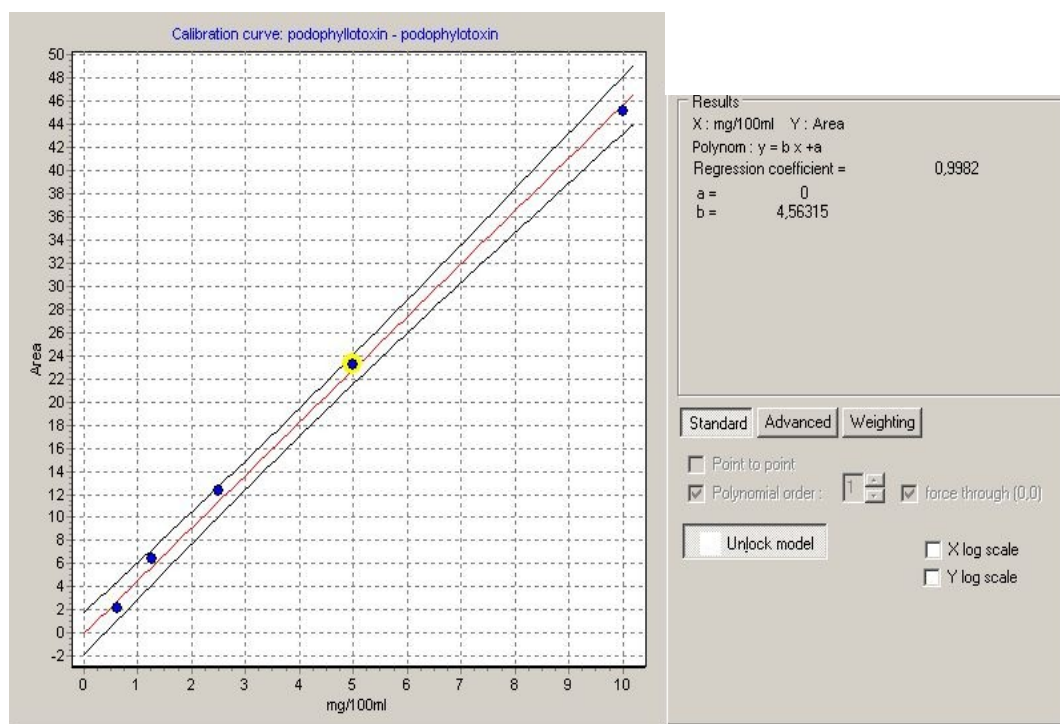
#### 4.9.2 Podmienky HPLC analýzy

K HPLC analýze podofylotoxínu bola použitá kvapalná chromatografická sústava Jasco 2000-Plus.

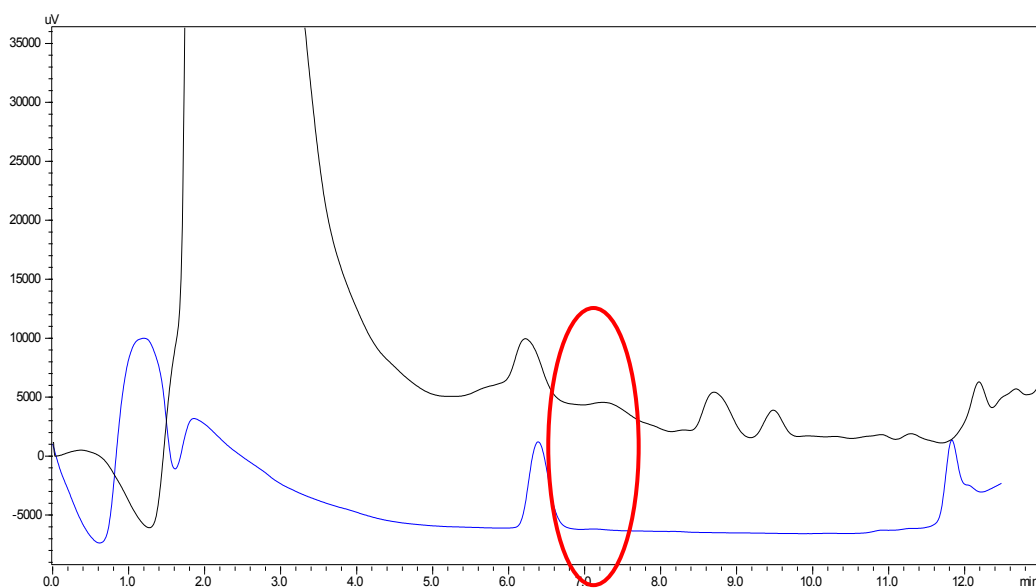
V tejto sústave bola použitá kolóna LiChrospher RP-18 250x4 mm (veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$ ) s ochrannou predkolónou, ktorá je z rovnakého materiálu. Na detekciu bol použitý detektor diódového poľa. Pre lepšie identifikovanie píkov boli referenčné vlnové dĺžky nastavené na 270 a 290 nm a hlavná vlnová dĺžka bola nastavená na 280 nm. Teplota vyvíjania kolóny 25 °C, vstrekaný objem štandardov i vzoriek 20  $\mu\text{l}$ , prietoková rýchlosť mobilnej fázy je 1ml/min.

Mobilná fáza bola zložená z nasledujúcich zložiek (A) metanol/voda/ kyselina fosforečná (60:39,7:0,3; v/v/v) a (B) metanol/kyselina fosforečná (99,7:0,3; v/v).

Gradientová elúcia prebiehala nasledovne: 0-8 minút, 0-80%; 8-9 minút, 80-100%; 9-10 minút, 100%; 10-11 minút, 100%-0%; 11-13 minút, 0% B rozpúšťadla. [76]



Obr.č.12. Kalibračná krivka podofylotoxínu



Obr.č.13. Príklad chromatografického záznamu

(čierny záznam – elicitovaná vzorka, modrý záznam – štandard 10 µg.ml<sup>-1</sup>)

## 4.10 Štatistické spracovanie dát

Pre spracovanie 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

Štatistické spracovanie nameraných hodnôt obsahu podofylotoxínu v explantátových kultúrach *Juniperus virginiana* L. bolo prevedené na základe T-testu (test významnosti rozdielu dvoch priemerov), pre zvolenú hladinu významnosti  $p = 0,05$ .

Testovacie kritérium definuje tento vzťah:

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

T – testovacie kritérium

$x_1$  – aritmetický priemer kontrolného súboru

$x_2$  – aritmetický priemer pokusného súboru

$s_1$  – smerodajná odchýlka kontrolného súboru

$s_2$  – smerodajná odchýlka pokusného súboru

$n_1$  – počet členov kontrolného súboru

$n_2$  – počet členov pokusného súboru

Počet stupňov voľnosti definuje tento vzťah:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

$v$  – počet stupňov voľnosti

$n_1$  – počet členov kontrolného súboru

$n_2$  – počet členov pokusného súboru

Počet členov kontrolného a pokusného súboru je  $n_1 = n_2 = 2$ , takže platí  $v = 2$ . Pri danom počte stupňov voľnosti  $v = 2$  a hladine významnosti  $p = 0,05$  je kritická hodnota testovacieho kritéria  $t(v)_p = 3,182$ . Štatisticky významné sú tie výsledky, u ktorých je hodnota testovacieho kritéria vyššia než kritická hodnota. [77]

Ako kontrolné hodnoty k výpočtu testovacieho kritéria pre odbery po 6, 24 a 68 h boli využité hodnoty odberu v čase 6 h, pretože v tak krátkych časových intervaloch nie sú zmeny obsahu podofylotoxínu u neelicitovanej kultúry významné. Kontrolná hodnota obsahu podofylotoxínu pre odber 168 hodín bola stanovená.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Tabuľky

Tabuľka 2. Vplyv kyseliny salicylovej na produkciu podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* (varieta 'Glauca')

Koncentrácia Elicitoru (mmol.l <sup>-1</sup> )	Doba aplikácie elicitoru (h)	Elicitácia		Kontrola		T-test
		Priemerný obsah PTOX (%)	Smerodajná odchýlka	Priemerný obsah PTOX (%)	Smerodajná odchýlka	
I 0,01	6	0,017	0,000	0,025	0,001	8,000
	24	0,022	0,004	0,025	0,001	0,688
	48	0,021	0,002	0,025	0,001	1,919
	168	0,016	0,001	0,023	0,001	4,041
II 0,1	6	0,020	0,001	0,025	0,001	2,887
	24	0,029	0,001	0,025	0,001	2,858
	48	0,025	0,002	0,025	0,001	0,213
	168	0,023	0,004	0,023	0,001	0,136
III 1	6	0,021	0,001	0,025	0,001	2,309
	24	0,026	0,002	0,025	0,001	0,213
	48	0,023	0,001	0,025	0,001	1,155
	168	0,021	0,002	0,023	0,001	1,066
IV 10	6	0,023	0,004	0,025	0,001	0,459
	24	<b>0,052</b>	0,002	0,025	0,001	11,300
	48	<b>0,036</b>	0,001	0,025	0,001	6,351
	168	<b>0,032</b>	0,001	0,023	0,001	5,196

Zvýraznené hodnoty obsahu podofylotoxínu sú štatisticky významne vyššie než hodnoty kontroly; p = 0,05.

**Tabuľka 3.** Vplyv kyseliny škoricovej na produkciu podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* (varieta 'Glauca')

Koncentrácia elicitoru (mmol.l <sup>-1</sup> )	Doba aplikácie elicitoru (h)	Elicitácia		Kontrola		T-test
		Priemerný obsah PTOX (%)	Smerodajná odchýlka	Priemerný obsah PTOX (%)	Smerodajná odchýlka	
<b>I</b>  <b>0,1</b>	<b>6</b>	0,013	0,001	0,027	0,001	11,839
	<b>24</b>	0,015	0,001	0,027	0,001	6,928
	<b>48</b>	0,012	0,001	0,027	0,001	8,660
	<b>168</b>	0,012	0,006	0,023	0,003	1,635
<b>II</b>  <b>1</b>	<b>6</b>	0,024	0,000	0,027	0,001	3,000
	<b>24</b>	0,025	0,001	0,027	0,001	2,041
	<b>48</b>	0,021	0,001	0,027	0,001	3,464
	<b>168</b>	0,021	0,001	0,023	0,003	0,603
<b>III</b>  <b>10</b>	<b>6</b>	<b>0,058</b>	0,001	0,027	0,001	17,898
	<b>24</b>	<b>0,147</b>	0,005	0,027	0,001	23,665
	<b>48</b>	<b>0,043</b>	0,001	0,027	0,001	12,656
	<b>168</b>	0,030	0,001	0,023	0,003	2,111
<b>IV</b>  <b>100</b>	<b>6</b>	0,018	0,000	0,027	0,001	9,000
	<b>24</b>	0,019	0,001	0,027	0,001	4,619
	<b>48</b>	0,018	0,001	0,027	0,001	7,757
	<b>168</b>	0,017	0,000	0,023	0,003	2,000

Zvýraznené hodnoty obsahu podofylotoxínu sú štatisticky významne vyššie než hodnoty kontroly; p = 0,05.



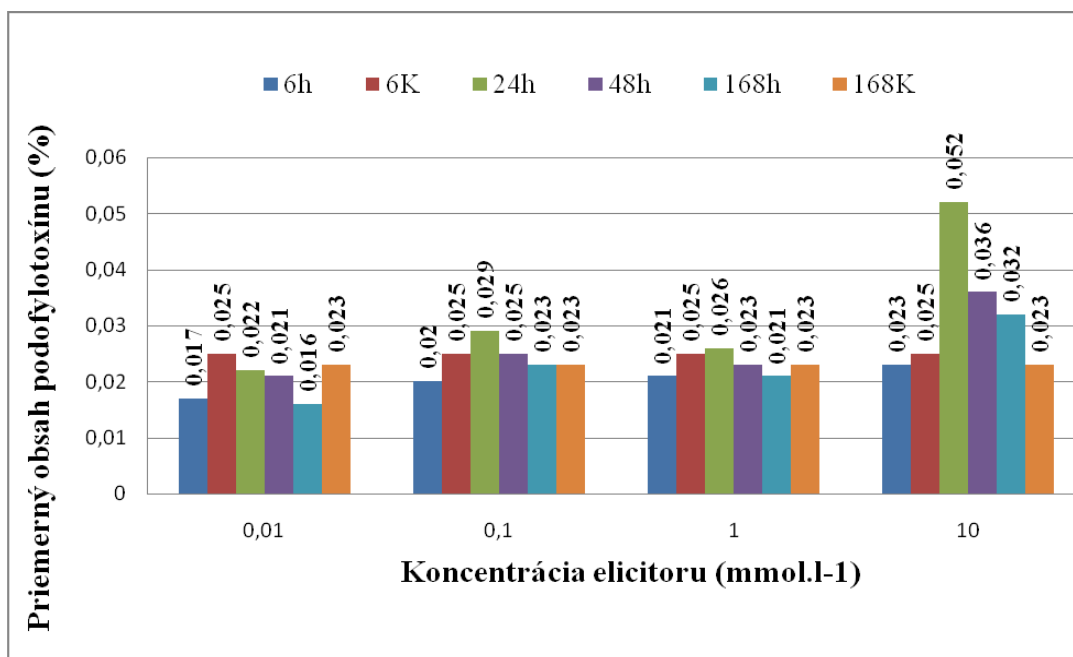
**Tabuľka 4.** Vplyv kyseliny škoricovej na produkciu podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* (varieta 'Hetzii')

Koncentrácia elicitoru (mmol.l <sup>-1</sup> )	Doba aplikácie elicitoru (h)	Elicitácia		Kontrola		T-test	
		Priemerný obsah PTOX (%)	Smerodajná odchýlka	Priemerný obsah PTOX (%)	Smerodajná odchýlka		
0,1	I	6	0,015	0,002	0,018	0,001	1,342
		24	0,018	0,001	0,018	0,001	0,000
		48	0,012	0,001	0,018	0,001	4,243
		168	0,009	0,002	0,015	0,001	2,683
1	II	6	0,017	0,002	0,018	0,001	0,447
		24	0,020	0,001	0,018	0,001	1,414
		48	0,016	0,003	0,018	0,001	0,632
		168	0,014	0,002	0,015	0,001	0,447
10	III	6	0,027	0,001	0,018	0,001	6,364
		24	0,032	0,001	0,018	0,001	9,899
		48	0,024	0,001	0,018	0,001	4,243
		168	0,019	0,002	0,015	0,001	1,789
100	IV	6	0,022	0,001	0,018	0,001	2,828
		24	0,025	0,001	0,018	0,001	4,950
		48	0,020	0,002	0,018	0,001	0,894
		168	0,015	0,003	0,015	0,001	0,000

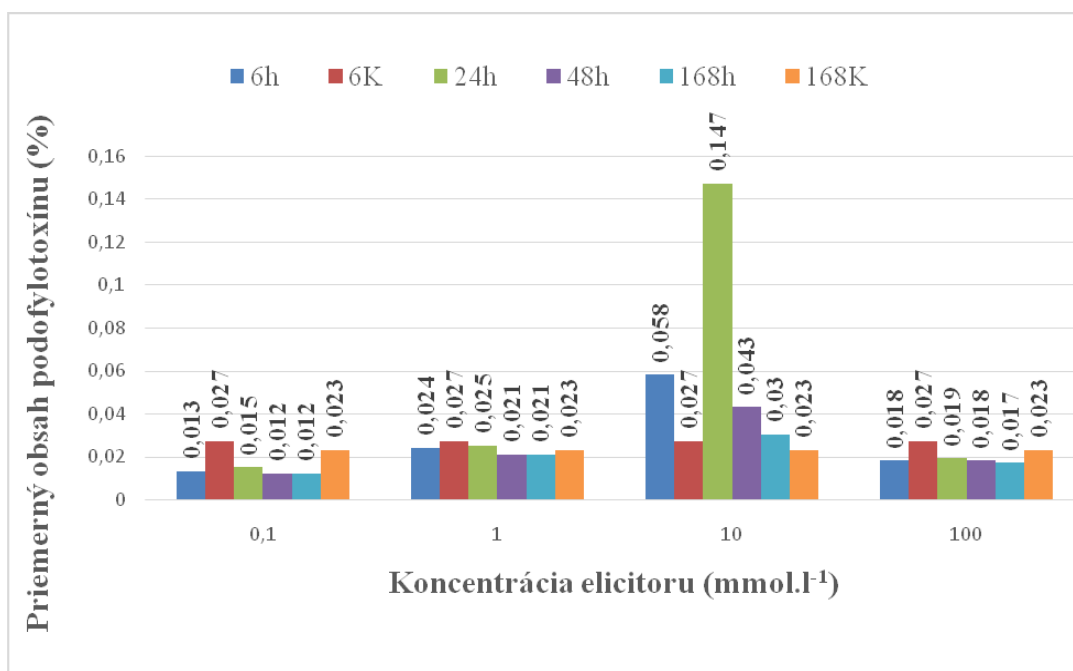
Zvýraznené hodnoty obsahu podofylotoxínu sú štatisticky významne vyššie než hodnoty kontroly;  $p = 0,05$ .

## 5.2 Grafy

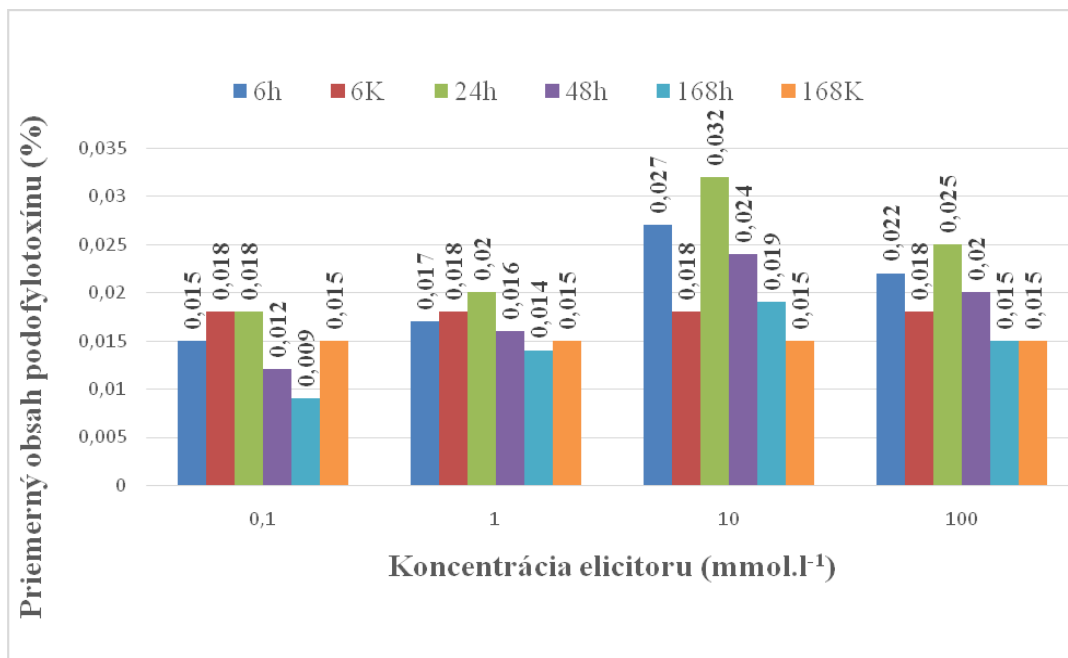
**Graf 1.** Závislosť obsahu podofýlotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* varieta 'Glauca' na dobe pôsobenia a koncentráciách kyseliny salicylovej



**Graf 2.** Závislosť obsahu podofýlotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* (varieta 'Glauca') na dobe pôsobenia a koncentráciách kyseliny škoricovej



**Graf 3.** Závislosť obsahu podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* (varieta 'Hetzii') na dobe pôsobenia a koncentráciách kyseliny škoricovej



## 6. DISKUSIA

Podofylotoxín, je lignan. V niektorých rastlinných druhoch sa vyskytuje prirodzene. Okrem iných účinkov má aj cytotoxický efekt, ale pre svoju toxicitu slúži hlavne ako prekursor pre výrobu semi-syntetických derivátov tenipozidu, etopozidu a etopofosu, ktoré sú menej toxické, a niektoré majú vyššiu rozpustnosť. Jeho chemická syntéza je možná, ale pre komerčné využitie je veľmi nákladná. So vzrastajúcou potrebou semi-syntetických derivátov podofylotoxínu na liečbu rakoviny, rastie aj dopyt po podofylotoxíne. Medzi tradičné zdroje podofylotoxínu patrí rod *Podophyllum*. Jeho výskyt bol identifikovaný aj v druhoch *Dysosma*, *Hyptis*, *Jeffersonia*, *Juniperus*, *Linum*, *Thuja*, *Teuricum* a *Thymus*. Keďže syntéza je nákladná a prírodné zdroje nemusia byť dostatočné pre zvyšujúcu sa spotrebu, je veľmi vítané použitie explantátových kultúr ako alternatívneho zdroja na produkciu podofylotoxínu. Závažnou nevýhodou oproti intaktným rastlinám je ich nízka produkcia metabolitov. Jednou z najviac účinných stratégií pre zvýšenie produkcie metabolitov je metóda elicitácie a pridávanie prekursoru do média. [1, 3, 5, 76, 78, 79]

Cieľom tejto diplomovej práce bolo sledovať vplyv rôznych koncentrácií biotického elicitora (kyseliny salicylovej) a prekursora fenypropánového metabolizmu (kyseliny škoricovej) na suspenznú kultúru *Juniperus virginiana* varieta 'Glaucá' a 'Hetzii' a skúmať množstvo podofylotoxínu.

Suspenzné kultúry *Juniperus virginiana* varieta 'Glaucá' a 'Hetzii' boli odvodené zo štvorročnej kalusovej kultúry a pestované na živnom médiu podľa Schenka a Hildebrandta s prídavkom 15 mg.l<sup>-1</sup> kyseliny askorbovej, a rastových regulátorov 3,0 mg.l<sup>-1</sup> kyseliny  $\alpha$ -naftyloctovej, 0,2 mg.l<sup>-1</sup> kinetínu. Kultivačné médium a prídavok najvýhodnejšej kombinácie rastových regulátorov boli zvolené na základe údajov v literatúre a diplomových prácach zaoberajúcich sa kultúrou *Juniperus virginiana*. [75, 76, 80, 81]

Produkcia podofylotoxínu bola u *Juniperus virginiana* variety 'Glaucá' sledovaná v 2. a v 6. pasáži a u variety 'Hetzii' v 8. pasáži.

Z výsledkov biotickej elicitácie suspenznej kultúry *Juniperus virginiana* L. varieta 'Glaucá' elicítovanej vodným roztokom kyseliny salicylovej (Tabuľka 2, Graf 1) je evidentné zvýšenie po 24, 48 a 168 hodinovom pôsobení elicitoru v najvyššej koncentrácií 10 mmol.l<sup>-1</sup>.

Najvyššia hodnota podofylotoxínu (0,052 %) bola nameraná po 24 hodinovom pôsobení kyseliny salicylovej o koncentrácii 10 mmol.l<sup>-1</sup>. V tomto prípade bolo oproti kontrole zaznamenané štatisticky významné zvýšenie obsahu o 108%. Ďalšie významné zvýšenia boli namerané po 48 hodinách, kedy bol zaznamenaný nárast oproti kontrolnej kultúre o 44 % a po 168 hodinách o 39 %. V oboch prípadoch bola koncentrácia elicitoru 10 mmol.l<sup>-1</sup>.

Po pôsobení najnižšej koncentrácie kyseliny salicylovej 0,01 mmol.l<sup>-1</sup> došlo po 6 a 168 hodinách k štatisticky významnému zníženiu v porovnaní s kontrolou.

Vplyv prekursoru fenypropánového metabolizmu, kyseliny škoricovej, bol hodnotený po pôsobení na suspenznú kultúru *Juniperus virginiana* L. varieta 'Glaucá' (Tabuľka 3, Graf 2). Najvýraznejšie zvýšenie obsahu podofylotoxínu bolo zaznamenané po 24 hodinovom pôsobení škoricovej kyseliny o koncentrácii 10 mmol.l<sup>-1</sup>. V tomto prípade bol obsah podofylotoxínu 0,147 %, čo predstavuje oproti kontrolnej kultúre štatisticky významné zvýšenie o 444 %.

Pri rovnakej koncentrácii elicitoru, ale po 6 a 48 hodinách bolo taktiež zaznamenané štatisticky významné zvýšenie. V prvom z uvedených o 115 % v porovnaní s kontrolou a v druhom o 59 %.

Faktom však ostáva, že pri elicitácii kyselinou škoricovou o koncentráciách 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>, 1 mmol.l<sup>-1</sup>, 100 mmol.l<sup>-1</sup> došlo vo väčšine prípadov k zníženiu obsahu podofylotoxínu.

Sledovaný bol aj obsah podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* L. varieta 'Hetzii' po pôsobení kyseliny škoricovej (Tabuľka 4, Graf 3). Maximálny vplyv na produkciu podofylotoxínu bol zistený po 24 hodinovej aplikácii kyseliny škoricovej v koncentrácii 10 mmol.l<sup>-1</sup>. Množstvo podofylotoxínu bolo 0,32 %, čo je o 77 % viacej ako u kontrolnej kultúry. Pri tej istej koncentrácii po 6 hodinovom pôsobení bol obsah podofylotoxínu v porovnaní s kontrolou zvýšený o 50 % po 48 hodinovom pôsobení o 33 %.

Štatisticky významné zvýšenie obsahu podofylotoxínu nastalo aj v prípade pôsobenia elicitoru o koncentrácii 100 mmol.l<sup>-1</sup> po dobu 24 hodín. Oproti kontrolnej kultúre je zvýšenie obsahu podofylotoxínu o 38 %.

Pri elicitácii kyselinou škoricovou bol u oboch variet ('Glaucá' a 'Hetzii') maximálny obsah podofylotoxínu dosiahnutý po 24 hodinovom pôsobení kyseliny škoricovej

v koncentrácii  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$ . U variety 'Glauca' bol obsah podofylotoxínu (0,147 %) viditeľne vyšší v porovnaní s varietou 'Hetzii' (0,032 %).

U variety 'Glauca' bolo pri rovnakej koncentrácii obidvoch elicitorov  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  a rovnakej dobe pôsobenia, 24 hodín, zaznamenané väčšie množstvo podofylotoxínu 0,147 % po pôsobení kyseliny škoricovej. Pri porovnávaní účinností elicitoru je prekursor fenypropánového metabolizmu (kyselina škoricová) účinnejší ako biotický elicitor (kyselina salicylová).

V literatúre je možné nájsť viacero príkladov vplyvu kyseliny salicylovej ako elicitoru.

V bunkových kultúrach *Linum album* po aplikácii kyseliny salicylovej v koncentrácii  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po dobu 72 hodín došlo k zvýšeniu obsahu podofylotoxínu o viac ako trojnásobok vzhľadom ku kontrolnej kultúre. V tomto prípade došlo k zvýšeniu produkcie podofylotoxínu bez zníženia množstva biomasy. Analýza ukázala, že v bunkách ošetrovaných kyselinou salicylovou došlo k expresii génov kódujúcich PAL, cinamoyl-CoA reductázu a škoricovej alkohol-dehydrogenázy (CAD). Všetky uvedené zložky patria k prvým krokom biosyntézy podofylotoxínu. Expresia pinorezinol-laricirezinol reductázového génu, ktorý je zapojený do jedného z posledných biosyntetických krokov podofylotoxínu, nie je ovplyvnená pôsobením salicylovej kyseliny. Tento fakt predstavuje v budúcnosti možnosť použitia na kontrolu biotechnologickej produkcie podofylotoxínu. [82]

Príkladom ďalšej úspešnej elicítácie za použitia kyseliny salicylovej v koncentráciách 1, 2, 5, 10, 15  $\text{mmol.l}^{-1}$  je jej pôsobenie na produkciu antracénových derivátov na trojročnú a deväťročnú kultúru *Rheum palmatum* L. Doba pôsobenia elicitoru bola 6, 24 a 48 hodín. 24 hodinová aplikácia kyseliny salicylovej v koncentrácii  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  zvýšila produkciu antracénových derivátov u trojročnej kalusovej kultúry o 83 % oproti kontrole. K najvyššej produkcii u deväťročnej kalusovej kultúry došlo po 6 hodinovom pôsobení  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  (zvýšenie o 72 %).

Pre elicítáciu suspenznej kultúry je optimálne 48 hodinové pôsobenie kyseliny salicylovej v koncentrácii  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$ . [83]

K suspenznej kultúre buniek *Andrographis paniculata* bola pridaná kyselina salicylová v koncentráciách  $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  a  $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  a pôsobenie

elicitoru bolo skúmané po 24, 48 a 72 hodinách. Najlepší výsledok bol dosiahnutý po pôsobení  $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$  kyseliny salicylovej po dobu 24 hodín, kedy došlo k zvýšeniu obsahu flavonoidov o 1,39-násobok v porovnaní s kontrolou. [84]

Existujú štúdie, ktoré sa zaoberali zvýšením produkcie diterpénových alkaloidov rodu *Taxus*, elicítáciou kyselinou salicylovou. Suspenzná kultúra *T. chinensis* varieta 'Mairei' bola elicítovaná optimálnou koncentráciou  $20 \text{ mg/l}$  salicylovej kyseliny, čo viedlo k produkcii taxolu. V tomto prípade došlo k najvýraznejšiemu zvýšeniu PAL po troch dňoch po pridaní salicylovej kyseliny. [85]

Koncept pridávania prekursoru je založený na myšlienke, že zlúčenina, ktorá je medziproduktom alebo zlúčeninou stojacou na začiatku biosyntézy sekundárnych metabolitov má dobrý predpoklad pre zvýšenie výťažku finálneho produktu. [79]

Existuje viacero prípadov, kedy pridanie prekursoru alebo medziproduktu zvýšilo produkciu sekundárnych metabolitov v rastlinách.

V *in vitro* kultúre *Scutellaria baicalensis* Georgii došlo k nárastu obsahu flavonoidov pridaním kyseliny škoricovej v koncentrácií  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  po dobu 20 hod a 40 hod. [79] Taktiež v kultúre *Rauwolfia serpentina* kyselina škoricová v koncentrácii  $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  najúčinnšie zvýšila obsah fenolických látok. [86]

Muráriková skúmala vo svojej diplomovej práci vplyv roztokov kyseliny škoricovej v 70% etanole o koncentráciách  $0,10 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $1,00 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $10,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  na obsah flavonoidov a izoflavonoidov v suspenznej kultúre *Trifolium pratense* L. (varieta 'DO-8' a 'Tempus'). Najvýraznejšie zvýšenie obsahu flavonoidov v suspenznej kultúre *Trifolium pratense* L. (varieta 'DO-8') dosiahla elicítácia kyselinou škoricovou o koncentrácii  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  po dobu 24 hod, kedy sa ich produkcia štatisticky významne zvýšila o 98 % v porovnaní s kontrolou. Na produkciu izoflavonoidov u variety 'DO-8' mala najpozitívnejší vplyv koncentrácia  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  a doba pôsobenia 48 hodín, kedy došlo k zvýšeniu genistínu o 800 % a daidzeinu o 300 %. [87]

Kyselina škoricová bola použitá taktiež u explantátových kultúr *Dionaea muscipula* a *Drosera capensis*, kde zvýšila produkciu naftochinónov a flavonoidov len nevýznamne. [88] Lepších výsledkov za použitia kyseliny škoricovej bolo dosiahnuté pri pokusoch s kultúrami *Psoralea corylifolia*, u ktorých významne vzrástlo množstvo furanokumarínu psoralenu, nasyntetizovaného touto kultúrou. [89]

Z výsledkov tejto diplomovej práce je zrejmé, že v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* L. je produkcia podofylotoxínu nízka. Jedným z dôvodov môže byť to, že sa jedná o mladú a rýchlo rastúcu suspenznú kultúru a tá väčšinou akumuluje len malé množstvo metabolitov. Produkciu však môže zvýšiť vplyv určitého stresu – napr. zníženie koncentrácie živín v roztoku, vynechanie rastového regulátoru alebo aplikácia elicitoru či prekursoru biosyntézy do média, čo sa v prípade sledovaných látok potvrdilo. Kyselina salicylová a škoricová môžu byť použité k zvýšeniu produkcie v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* varieta 'Glauca' a kyselina škoricová vo variete 'Hetzi'.



## 7. ZÁVER

Z diplomovej práce môžeme vyvodit' nasledujúce výsledky:

- ❖ V suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* varieta 'Glauca' bol najvyšší obsah podofylotoxínu (0,052 %) zaznamenaný po 24 hodinovej aplikácii kyseliny salicylovej ako elicitoru, v koncentrácií 10 mmol.l<sup>-1</sup>, kedy bolo zaznamenané štatisticky významné zvýšenie obsahu o 108 % v porovnaní s kontrolnou kultúrou.
- ❖ V suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* varieta 'Glauca' bol najvyšší obsah podofylotoxínu (0,147 %) zaznamenaný po 24 hodinovej aplikácii kyseliny škoricovej, ako elicitoru, v koncentrácií 10 mmol.l<sup>-1</sup>, kedy bolo zaznamenané štatisticky významné zvýšenie obsahu o 444 % v porovnaní s kontrolnou kultúrou.
- ❖ V suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* varieta 'Hetzii' bol najvyšší obsah podofylotoxínu (0,032 %) zaznamenaný po 24 hodinovej aplikácii kyseliny škoricovej ako elicitoru, v koncentrácií 10 mmol.l<sup>-1</sup>, kedy bolo zaznamenané štatisticky významné zvýšenie obsahu o 77 % v porovnaní s kontrolnou kultúrou.
- ❖ Porovnanie produkcie podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* elicítovanej kyselinou škoricovou a salicylovou ukazuje, že maximálne zvýšenie obsahu podofylotoxínu vo všetkých prípadoch bolo vyvolané po 24 hodinovej aplikácii koncentrácie 10 mmol.l<sup>-1</sup>.

## 8. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Ramirez-Estrada K., Vidal-Limon H., Hidalgo D., et. al.: Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*. 2016; 21, 182-205.
2. Tůmová L., Tůma J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. *Chemické listy*. 2009; 103, 503-510.
3. Arroo R. R. J., Alfermann A. W., Medarde M., et al.: Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochemistry Reviews*. 2002; 1, 27–35.
4. Gordaliza M., García P. A., Miguel Del Corral J. M., et al.: Podophyllotoxin: Distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*. 2004; 44, 441–459.
5. Yue W., Ming Q.-L., Lin B., et al.: Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016; 36, 215–232.
6. Kováč J.: Explantátové kultury rostlin. 1. přepr. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci 1995.
7. Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018; 248, 1–18.
8. Procházka S., Macháčková I., Krekule J., et al.: Fyziologie rostlin. Praha: Academia 1998.
9. Hrubíková K., Bežo M., Kutišová J., et al.: Explantátové kultury rostlin. Nitra: SPU 2009.
10. Hradilík J.: Rostlinné explantáty. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně 2005.
11. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Praha: Karolinum 1992.
12. Procházka S., Šebánek J., et al.: Regulátory rostlinného růstu. Praha: Academia 1997.

13. Bhatia S., Sharma K., Dahiya R., et al.: Modern applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. Boston: Academic Press 2015.
14. Filová A.: Production of Secondary Metabolites. Research Journal of Agricultural Science. 2014; 46, 236–246.
15. Santos R. B., Abranches R., Fischer R., et al.: Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. Frontiers in Plant Science. 2016; 7, 1–12.
16. Ramachandra Rao S., Ravishankar G. A.: Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 2002; 20, 101–153.
17. Namdeo A. G.: Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites : A Review. Pharmacognosy Reviews. 2007; 1, 69–79.
18. Narayani M., Srivastava S.: Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. Phytochemistry Reviews. 2017; 16, 1227–1252.
19. Giri C. C., Zaheer M.: Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2016; 126, 1–18.
20. Al-Shalabi Z., Araujo A., Bulgakov V. P., et al.: Biotechnology of Hairy Root Systems. Australia: Springer 2013.
21. Luo X., Weng S., Ni X., et al.: The effects of elicitation on the expression of key enzyme genes and on production of tropane alkaloids in *Anisodus acutangulus* plant. Biologia. 2012; 67, 352–359.
22. Yousefzadi M., Sharifi M., Behmanesh M., et al.: The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture. Plant Physiology and Biochemistry. 2012; 56, 41–46.
23. Cai Z., Riedel H., Saw N. M. M. T., et al.: Effects of elicitors and high hydrostatic pressure on secondary metabolism of *Vitis vinifera* suspension culture. Process Biochemistry. 2011; 46, 1411–1416.
24. Ye H., Huang L.-L., Chen S.-D., et al.: Pulsed electric field stimulates plant secondary metabolism in suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnology and Bioengineering. 2004; 88, 788–795.

25. Kang D., Zhang H., Zeng Q., et al.: Response of *Camptotheca acuminata* calli stimulated by mechanical vibration. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011; 33, 711–716.
26. Gadzovska S., Maury S., Delaunay A., et al.: The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2013; 113, 25–39.
27. --: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/salicylic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/salicylic_acid#section=Top).  
použité 28.7.2018
28. Spilková J., Martin J., Siatka T., et al.: *Farmakognozie*. Praha: Karolinum 2016.
29. Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R.: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2005; 23, 283–333.
30. Chen Z., Zheng Z., Huang J., et al.: Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signalling and Behavior*. 2009; 4, 493–496.
31. Wang L., Tsuda K., Truman W., et al.: CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. *Plant Journal*. 2011; 67, 1029–1041.
32. Khan M. I. R., Fatma M., Per T. S., et al.: Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6, 1–17.
33. Cordelier S., Ruffray P., Fritig B., et al.: Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Molecular Biology*. 2003; 51, 109–118.
34. Verma V., Ravindran P., Kumar P. P.: Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*. 2016; 16, 1–10.

35. Cao H., Glazebrook J., Clarke J. D., et al.: The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*. 1997; 88, 57–63.
36. Gondor O. K., Janda T., Soós V., et al.: Salicylic Acid Induction of Flavonoid Biosynthesis Pathways in Wheat Varies by Treatment. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7, 1–12.
37. --: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444539#section=Top>.  
použité 28.7.2018
38. Tomko J., Kresánek J., Hubík J., et al.: *Farmakognózia učebnica pre farmaceutické fakulty 2. opravené vyd.* Martin: Osveta 1999.
39. Shuab R., Lone R., Koul K. K.: Cinnamate and cinnamate derivatives in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016; 38, 1–9.
40. Sova M.: Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2012; 12, 749–767.
41. Hejny S., Slavík B.: *Květena České socialistické republiky I*. 1. vyd. Praha: Academia 1988.
42. --: [http://www.conifers.org/cu/Juniperus\\_virginiana.php](http://www.conifers.org/cu/Juniperus_virginiana.php). použité 3.7.2018
43. Řepka R., Koblížek J.: *Systematická botanika*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně 2007.
44. --: [https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs\\_juvi.pdf](https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_juvi.pdf). použité 3.7.2018
45. Dong X.-L., Li B.-H., Zhang Z.-F., et al.: Effect of environmental conditions on germination and survival of teliospores and basidiospores of the pear rust fungus (*Gymnosporangium asiaticum*). *European Journal of Plant Pathology*. 2006; 115, 341–350.
46. Pierce A. M., Reich P. B.: The effects of eastern red cedar (*Juniperus virginiana*) invasion and removal on a dry bluff prairie ecosystem. *Biological Invasions*. 2009; 12, 241–252.
47. Jahodář L.: *Farmakobotanika semenné rostliny*. Praha: Karolinum 2011.
48. --: <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=29091>. použité 3.7.2018

49. Van Els P.: Effects of *Juniperus virginiana* encroachment on plant and avian diversity in Oklahoma cross timbers forests. Diploma thesis. Oklahoma State University 2009.
50. Krüssmann G.: Handbuch der Nadelgehölze Auflage. Berlin: Verlag Paul Parey 1983.
51. --: <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=263279&isprofile=0& použitě 4.7.2018>.
52. Cantrell C. L., Zheljazkov V. D., Osbrink W. L. A., et al.: Podophyllotoxin and Essentials oil profile of *Juniperus* and related species. *Industrial Crops and Products*. 2013; 43, 668-676.
53. Gawde A. J., Cantrell Ch. L., Zheljazkov V. D.: Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. *Industrial Crops and Products*. 2009; 30, 276–280.
54. Gilmane E. F., Watson D. G.: *Juniperus virginiana* Eastern Redcedar Fact Sheet st-327. Environmental Horticulture Department, University of Florida. 1993.
55. Trifunči S., Dorina A.: Studies on the optimal extraction of flavonoids from the fruit of *Juniperus virginiana* L. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*. 2010; 127–133.
56. Dunford N. T., Hiziroglu S., Holcomb R.: Effect of age on the distribution of oil in Eastern redcedar tree segments. *Bioresource Technology*. 2007; 98, 2636–2640.
57. Niu L., Wang Y., Wang Ch., et al.: Structure of 4 - demethylepipodophyllotoxin in complex with tubulin provides a rationale for drug design. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017; 493, 718–722.
58. Umezawa T.: Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*. 2003; 2, 371–390.
59. Canel C., Moraes R. M., Dayan F. E., et al.: Podophyllotoxin. *Phytochemistry*. 2000; 54, 115–120.

60. Giri A., Lakshmi M. N.: Production of podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum*: A potential natural product for clinically useful anticancer drugs. *Cytotechnology*. 2000; 34, 17–26.
61. Guerrero E., Abad A., Montenegro G., et al.: Analgesic and anti-inflammatory activity of podophyllotoxin derivatives. *Pharmaceutical Biology*. 2013; 51, 566–572.
62. Farkya S., Bisaria V. S., Srivastava A. K.: Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology and biotechnology*. 2004; 65, 504–519.
63. Yousefzadi M., Sharifi M., Behmanesh M., et al.: Podophyllotoxin: Current approaches to its biotechnological production and future challenges. *Engineering in Life Sciences*. 2010; 10, 281–292.
64. Ardalani H., Avan A., Ghayour-Mobarhan M.: Podophyllotoxin : a novel potential natural anticancer agent. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2017; 7, 285–294.
65. Pigatto M. C., de Araujo B. V., Torres B. G. S., et al.: Population Pharmacokinetic Modeling of Etoposide Free Concentrations in Solid Tumor. *Pharmaceutical Research*. 2016; 33, 1657–1670.
66. Lerndal T., Svensson B.: A clinical study of CPH 82 vs methotrexate in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2000; 39, 316–320.
67. Renouard S., Lopez T., Hendrawati O., et al.: 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, 8101-8107.
68. Holland C. K., Berkovich D. A., Kohn M. L., et al.: Structural basis for substrate recognition and inhibition of prephenate aminotransferase from *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2018; 94, 304–314.
69. Tzin V., Galili G.: New Insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*. 2010; 3, 956–972.

70. Parthasarathy A., Cross P. J., Dobson R. C. J., et al.: A Three-Ring Circus: Metabolism of the Three Proteogenic Aromatic Amino Acids and Their Role in the Health of Plants and Animals. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018; 5, 1–30.
71. Ferrer J.-L., Austin M. B., Stewart C., et al.: Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2008; 46, 356–370.
72. Dixon R. A., Reddy M. S. S.: Biosynthesis of monolignols. Genomic and reverse genetic approaches. *Phytochemistry Reviews*. 2003; 2, 289–306.
73. Federolf K., Alfermann A. W., Fuss E.: Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*: Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin. *Phytochemistry*. 2007; 68, 1397–1406.
74. Schenk R. U., Hildebrandt A. C.: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotylenodous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 1972; 50, 199-204.
75. Kašparová M., Spilková J., Cvak L., et al.: Plant tissue cultures of *Juniperus virginiana*. *Natural Product Communications*. 2016; 11, 681–683.
76. Kašparová M., Martin J., Tůmová L., et al.: Production of Podophyllotoxin by Plant Tissue Cultures of *Juniperus virginiana* L. *Natural Product Communications* 2017; 12, 101-103.
77. Klemra P., Klemrová V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. 3.vydanie. Praha: Karolinum 1999.
78. Kumari A, Singh D, Kumar S.: Biotechnological interventions for harnessing podophyllotoxin from plant and fungal species: current status, challenges, and opportunities for its commercialization. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017; 37, 739–53.
79. Martin J., Dušek J.: Flavonoid accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgii *in vitro* cultures upon treatment with sodium cinnamate. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2007; 56, 280–283.



80. Damborská V.: Optimalizace růstu explantátové kultury *Juniperus virginiana* vitro. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2014.
81. Předota V.: Explantátová kultura *Juniperus virginiana*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2014.
82. Yousefzadi M., Sharifi M., Behmanesh M., et al.: 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, 1739–1743.
83. Kašparová M, Siatka T.: Vliv kyseliny salicylové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro*. *Česká a slovenská farmacie*. 51, 2002, 177- 181.
84. Mendhulkar V. D., Vakil Ali M. M.: Elicitation of flavonoids by Salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. cell culture. *Research in Biotechnology*. 2013; 4, 1-9.
85. Wang Y.-D., Wu J.-Ch., Yuan Y.-J.: Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *Mairei*. *Cell Biology International*. 2007; 31, 1179-1183.
86. Nair, V. D., Panneerselvam, R., Gopi, R., Hong-bo, S.: Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. *Industrial Crops and Products*. 2013; 45, 406-415.
87. Muráriková K.: Ovplyvnenie produkcie explantátovej kultúry *Trifolium pratense* L. I. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.
88. Krolicka, A. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown *in vitro* by addition of elicitors. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008; 42, 216-221.
89. Parast, B. M. *In vitro* isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2011; 49, 1138-1146

## 9. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr.č.1. Schematické zobrazenie elicitorom ovplyvniteľných signálnych dráh [18]	21
Obr.č.2. Salicylová kyselina [27].....	22
Obr.č.3. Škoricová kyselina [37].....	24
Obr.č.4. <i>Juniperus virginiana</i> Botanická záhrada UPJŠ v Košiciach.....	27
Obr.č.5. <i>Juniperus virginiana</i> vetvička Botanická záhrada UPJŠ v Košiciach.....	28
Obr.č.6. Podofylotoxín [57].....	29
Obr.č.7. Štruktúra etopozidu (v ľavo) a tenipozidu [63].....	31
Obr.č.8. Etopofos (etopozid fosfát) [63].....	31
Obr.č.9. Mechanizmus účinku podofylotoxínu, etopozidu, tenipozidu a antivírový účinok [62].....	34
Obr.č.10. Syntéza fenylalanínu a tyrozínu [70].....	36
Obr.č.11. Zjednodušená syntéza podofylotoxínu a 6-metoxypodofylotoxínu [73]....	37
Obr.č.12. Kalibračná krivka podofylotoxínu.....	44
Obr.č.13. Príklad chromatografického záznamu.....	45

## 10. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognózie

Študent: Veronika Vargovčíková

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

Názov diplomovej práce: Produkcia podofylotoxínu v explantátovej kultúre *Juniperus virginiana*

Kľúčové slová: *Juniperus virginiana*, kalusové kultúry, suspenzné kultúry, podofylotoxín

Metóda pridávania elicitorou a prekurzorov je použiteľná pre zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov v explantátových kultúrach. Táto diplomová práca sa zaoberá sledovaním vplyvu biotického elicitoru (kyseliny salicylovej) a prekurzoru fenylpropánového metabolizmu (kyseliny škoricovej) na produkciu podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* (varietà 'Glauca' a 'Hetzii').

Suspenzné kultúry boli kultivované na živnom médiu podľa Shenka a Hildebranta pri teplote 25°C a svetelnej perióde 16 hodín svetlo a 8 hodín tma. Médium obsahovalo 15 mg.l<sup>-1</sup> kyseliny askorbovej, a rastové regulátory 3,0 mg.l<sup>-1</sup> kyselinu  $\alpha$ -naftyloctovú; 0,2 mg.l<sup>-1</sup> kinetín. Po 6, 24, 48 a 168 hodinovom pôsobení bol hodnotený vplyv vodného roztoku kyseliny salicylovej v koncentráciách 0,01 mmol.l<sup>-1</sup>, 0,10 mmol.l<sup>-1</sup>, 1,00 mmol.l<sup>-1</sup>, 10,0 mmol.l<sup>-1</sup> a vplyv roztoku kyseliny škoricovej v 60% liehu dodávanej v koncentráciách 0,10 mmol.l<sup>-1</sup>, 1,00 mmol.l<sup>-1</sup>, 10,0 mmol.l<sup>-1</sup>, 100 mmol.l<sup>-1</sup>. Obsah podofylotoxínu bol hodnotený metódou HPLC. U variety 'Glauca' bolo namerané najvýraznejšie štatisticky významné zvýšenie množstva podofylotoxínu v porovnaní s kontrolnou kultúrou o 108 % po 24 hodinovom pôsobení 10,0 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny salicylovej. U variety 'Glauca' bolo namerané najvýraznejšie zvýšenie množstva podofylotoxínu v porovnaní s kontrolnou kultúrou o 444 % po 24 hodinovom pôsobení 10,0 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny škoricovej. U variety 'Hetzii' bolo namerané najvýraznejšie zvýšenie podofylotoxínu v porovnaní s kontrolnou kultúrou o 77 % po 24 hodinovom pôsobení 10,0 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny škoricovej.

Porovnanie produkcie podofylotoxínu v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* elicítovanej kyselinou škoricovou a salicylovou ukazuje, že maximálne zvýšenie obsahu podofylotoxínu bolo dosiahnuté vo všetkých prípadoch po 24 hodinovej aplikácii koncentrácie 10 mmol.l<sup>-1</sup>.

Kyselina salicylová a škoricová môžu byť použité k zvýšeniu produkcie v suspenznej kultúre *Juniperus virginiana* varieta 'Glaucá' a kyselina škoricová vo variete 'Hetzií'.

## 11. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Student: Veronika Vargovčíková

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Production of podophyllotoxin by plant tissue cultures of *Juniperus virginiana*

Key words: *Juniperus virginiana*, callus cultures, suspension cultures, podophyllotoxin

Elicitor and precursor adding method can be used to enhance the production of secondary metabolites in explantate cultures.

This master's thesis is focused on the evaluation of the effects of biotic elicitor (salicylic acid) and phenylpropanoid metabolism precursor (cinnamic acid) on podophyllotoxin production in *Juniperus virginiana* (var. 'Glauca' and 'Hetzii') suspension cell culture.

Suspension cultures were cultivated on Schenk and Hildebrandt medium at 25°C and circadian period of 16 hours light and 8 hours dark. Medium contained 15 mg.l<sup>-1</sup> ascorbic acid and growth regulators 3.0 mg.l<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, 0.2 mg.l<sup>-1</sup> kinetin. The effects of salicylic acid aqueous solution 0.01 mmol.l<sup>-1</sup>, 0.10 mmol.l<sup>-1</sup>, 1.00 mmol.l<sup>-1</sup>, 10.0 mmol.l<sup>-1</sup> and cinnamic acid 60% alcohol solution 0.10 mmol.l<sup>-1</sup>, 1.00 mmol.l<sup>-1</sup>, 10.0 mmol.l<sup>-1</sup>, 100 mmol.l<sup>-1</sup> were examined after 6, 24, 48 and 168 hours. Podophyllotoxin content was evaluated using HPLC method. In 'Glauca' variety there was the 108 % increase in podophyllotoxin levels after 24-hour 10.0 mmol.l<sup>-1</sup> salicylic acid treatment and 444 % increase in podophyllotoxin levels after 24-hour 10.0 mmol.l<sup>-1</sup> cinnamic acid treatment in comparison to the control cultures. In 'Hetzii' variety there was the most significant increase (77%) in podophyllotoxin levels measured after 24-hour of 10.0 mmol.l<sup>-1</sup> cinnamic acid treatment in comparison to control cultures.

Comparison of the production of podophyllotoxin in *Juniperus virginiana* suspension culture elicited with cinnamic acid and salicylic acid showed that a maximum increase was achieved in all cases after a 24-hour application of 10.0 mmol.l<sup>-1</sup>.

Salicylic acid and cinnamic acid can be used as a potent elicitors to increase podophyllotoxin production in *Juniperus virginiana* 'Glaucua' variety and cinnamic acid in 'Hetzii' variety suspension cultures *in vitro*.