

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY
A EKOLOGIE



EXPLANTÁTOVÉ KULTURY VYŠŠÍCH ROSTLIN 28

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2007

Martina Lukášková

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Duškové, CSc. za odborné vedení a pomoc při sestavování diplomové práce. Děkuji také laborantce Markétě Šimůnkové za všestrannou ochotu a pomoc a Ireně Rejlové za provedení HPLC analýzy.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně,
pouze s použitím uvedené literatury.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. ŘEŠENÁ PROBLEMATIKA.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1. Sekundární metabolity.....	8
3.1.1. Obecná charakteristika.....	8
3.1.2. Produkce sekundárních metabolitů kulturami in vitro.....	9
3.2. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů.....	12
3.2.1. Morforegulace.....	12
3.2.2. Imobilizace.....	13
3.2.3. Genové inženýrství.....	14
3.2.4. Ovlivnění ploidie buněk.....	15
3.2.5. Optimalizace kultivačních podmínek.....	15
3.2.6. Mutace.....	18
3.2.7. Elicitace.....	18
3.2.8. Transformace rostlinných buněk bakteriemi rodu Agrobacterium....	20
3.2.9. Biotransformace.....	21
3.3. Arbutin.....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
4.1. Přístroje.....	26
4.2. Chemikálie.....	26
4.3. Použitý biologický materiál.....	28
4.4. Biotransformační pokusy.....	28
4.5. Analýza obsahových látek.....	29

5. VÝSLEDKY.....	31
5.1. Výsledky TLC analýzy.....	31
5.2. Výsledky HPLC analýzy.....	35
6. DISKUZE.....	40
7. ZÁVĚR.....	43
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	44
ABSTRACT.....	52

1. ÚVOD

Z odborné literatury posledních desetiletí je patrná snaha o hledání nových způsobů získávání sekundárních metabolitů rostlin. Je to proto, že se tyto látky často vyznačují biologickými aktivitami, pro které nacházejí uplatnění především ve farmaceutickém průmyslu. Jednou z možností je získávání sekundárních metabolitů cestou kultivace izolovaných rostlinných buněk v podmínkách *in vitro*.

Tyto tzv. explantátové kultury jsou životaschopné části rostlinného organismu (izolovaná embrya, kousky orgánů nebo pletiv či jednotlivé buňky), pěstované za aseptických podmínek v uzavřených nádobách na umělé živné půdě (kultivačním médiu). Podmínkou je pravidelné pasážování do nového média, které kromě anorganických a organických látek musí obsahovat také růstové stimulanty. [1]

Základem pěstování explantátových kultur je skutečnost, že rostlinné buňky jsou totipotenti, to znamená, že obsahují kompletní genetickou informaci výchozí rostliny. Díky této vlastnosti jsou v podmínkách kultivace *in vitro* schopné dělení a dosažení určitého stupně diferenciace v závislosti na vlivech okolí (zejména růstových látek v médiu). [2] Protože tkáňová kultura nediferencovaného pletiva má charakter závalového hojivého pletiva, označuje se také jako kalusová tkáňová kultura.

Využití tkáňových kultur ovšem nespočívá jen v získávání sekundárních metabolitů, ale také v mikropropagaci (způsob vegetativního množení) a ve šlechtění rostlin. Kultivace rostlinných buněk v podmínkách *in vitro* má oproti pěstování léčivých rostlin v zemědělských kulturách řadu výhod. Nezávisí na podnebí a počasí a probíhá ve sterilních podmínkách, tudíž jsou odvozené rostliny prosté bakteriálních a houbových

nákaz a škůdců. Touto cestou můžeme získávat látky i z rostlin, které vyžadují zvláštní klimatické podmínky a to celoročně. [3]

2. ŘEŠENÁ PROBLEMATIKA

Úkolem mé diplomové práce bylo ověření biotransformačních schopností tkáňové kultury *Centella asiatica* (L.) po přidání exogenních prekurzorů arbutinu - tyrozinu, hydrochinonu, kyseliny 4-hydroxybenzoové a parakumarové v koncentraci 100 mg/l do živného média na dobu 6, 12, 24, 48 a 168 hodin (týden).

Pokusy byly prováděny za světla jednak v suspenzích tkáňových kulturách, jednak na můstcích z filtračního papíru v tekutém živném médiu.

Produkce metabolitů byla hodnocena kvalitativně chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a kvantitativně pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) jak v kalusech, tak v živném médiu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. SEKUNDÁRNÍ METABOLITY

3.1.1. Obecná charakteristika

Rostliny mají schopnost z živin získaných ze vzduchu, vody a půdy syntetizovat kromě nepostradatelných složek svého těla, tzv. primárních metabolitů (aminokyselin, vitamínů, nukleových bází) také pestrou paletu látek, jejichž funkce není zcela zřejmá, a jež jsou pravděpodobně pro vlastní růst a reprodukci rostliny postradatelné. Označují se proto jako sekundární metabolity a metabolismus vedoucí k jejich vzniku z primárních metabolitů se nazývá metabolismus sekundární. [4]

Sekundární metabolity nevznikají v rostlinách všeobecně, ale jsou charakteristické pro určitý druh. Pro svoji tvorbu potřebují specifické podmínky. Mohou se ukládat v jiném orgánu, než ve kterém vznikají a v průběhu transportu se chemicky modifikovat. (Např. biosyntéza tropanového skeletu probíhá v kořenech a oxidace vytvořeného hyoscyaminu na skopolamin v nadzemních částech rostlin.)

Pro mnoho sekundárních látek obecně platí, že hydrofilní sloučeniny se ukládají ve vakuolách a lipofilní se ukládají v kanálcích, ve specializovaných útvarech (např. trichomy) nebo přímo do lipofilního matrixu, jako např. lignin či kutikula. [5]

Produktů sekundárního metabolismu je široká škála. I když nejsou přítomny výlučně v rostlinné říši, jsou to především rostliny, z nichž byly zatím izolovány. Důležitými skupinami sekundárních metabolitů jsou alkaloidy, steroidy, terpeny, flavonoidy, lignany, glykosidy atd. [6]

O významu sekundárních metabolitů pro rostliny se dosud polemizuje. Někteří autoři uvažují o jejich regulační funkci v organismu či o tom, že jsou produktem detoxikačního metabolismu. Pravděpodobně jsou však součástí adaptačních mechanismů a interakcí rostliny s prostředím. Mají obrannou úlohu proti býložravcům (hmyz, obratlovci) a proti mikroorganismům jako jsou bakterie, houby a viry. [3] Vnější podněty tedy mohou vyvolat v rostlinné buňce změny, které vedou ke kaskádě reakcí, jejichž výsledkem je nakonec tvorba a akumulace sekundárních metabolitů, které pomáhají rostlině k překonání stresových faktorů. Antimikrobiální sekundární metabolity se nazývají fytoalexiny. [7]

3.1.2. Produkce sekundárních metabolitů kulturami in vitro

Každá rostlinná buňka je totipotentní, to znamená, že má kompletní genetickou informaci výchozí rostliny potřebnou pro svůj růst a vývoj. Teoreticky by se tedy dalo předpokládat, že bude schopná produkovat tytéž sekundární metabolity jako výchozí rostlina. To dává možnost využití explantátových kultur k produkci sekundárních metabolitů in vitro. Tímto způsobem je možné získat stabilní systém produkující žádané přírodní látky v plně kontrolovatelných podmínkách, nezávisle na vnějších vlivech. [3]

Tkáňové kultury mají oproti tradičním způsobům získávání sekundárních metabolitů podstatné výhody: [4]

- syntéza probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách
- produkčním systémem jsou vyloučeny negativní biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz) v přírodě měnící produkci sek. metabolitů

- je možné selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů, vzniká pouze jeden (žádáný) izomer
- celý proces lze automatizovat a dosáhnout kontinuální produkce

Z nespočetného množství přírodních rostlinných látek významných z hlediska medicíny i průmyslu jen několik dosahuje hladiny komerční vysokoobjemové produkce. [8]

Jedním ze základních problémů je relativně pomalý růst rostlinných buněčných kultur a nízká produkce sekundárních metabolitů. [4]

Příčiny této nedostatečné produkce kulturami in vitro lze shrnout následovně: [3]

- **Častá vysoká genetická variabilita pěstovaných kultur**, která může ovlivnit produkci v pozitivním i negativním směru.
- **Ztráta zásobních a biosyntetických orgánů.** Rostliny produkují sekundární metabolity ve všech nebo pouze v některých orgánech. Tyto rozdíly mohou být kvantitativní i kvalitativní. Orgánová či pletivová specifika se převedením do tkáňové kultury často ruší. S výjimkou některých vysoce specializovaných buněk je většina schopna vytvářet kalus či suspenzi a za adekvátních podmínek probíhá charakteristický metabolismus dané rostliny. [9] U mnoha rostlinných druhů biosyntéza probíhá jen v jednom orgánu, zatímco akumulace je v celé rostlině nebo v různých orgánech. Např. tropanové alkaloidy – jejich biosyntéza probíhá v kořenech, ale akumulace ve všech orgánech, kde dochází k jejich další modifikaci. [10]
- **Rostlina neprodukuje sekundární metabolity během celého životního cyklu.** Rostliny i tkáňové kultury syntetizují sekundární metabolity většinou jen v určité ontogenetické fázi v určitém období růstového cyklu. Příkladem je Cassia, jejíž semena obsahují antrachinonové glykosidy, ale už během klíčení

je tvořen oktahydroantracen germichryson. [11] Některé kultury zpočátku produkují látky shodné s výchozí rostlinou či orgánem, po čase však syntéza ustává. To platí u *Digitalis purpurea*, kde dochází k zúžení spektra a nejpозději po 18. pasáži k úplnému zastavení produkce kardenolidů. Regenerované rostliny však produkují celé spektrum látek. [12]

- **Akumulace sekundárních metabolitů není výsledkem jednoduchého procesu, ale složitého komplexu interakcí mezi biosyntézou, transportem, transformací, odbouráváním, akumulací a exkrecí, které jsou navíc složitě regulovány.** V explantátu někdy dochází také ke změnám metabolických drah, jejichž důsledkem je kvalitativní změna spektra produkovaných látek. Látky, které se akumulují v buňkách, můžeme rozdělit do tří skupin:

a) vedlejší produkty metabolických drah

b) modifikované látky výchozích rostlin

c) látky dosud neznámé [13]

- **Převedení rostliny do tkáňové kultury představuje pro rostlinu značný stres,** který může vést k nežádoucím změnám v produkci sekundárních metabolitů.
- **Nepřítomnost nebo nedostatečné množství enzymů** odpovídajících za biosyntézu sekundárních metabolitů způsobené chybějící genetickou informací.
- **Nedostatečné podmínky pro aktivitu existujících enzymů** (teplota, pH, iontové prostředí...)
- **Nedostatečné množství prekurzorů v místě reakce.**
- **Odbourávání sekundárních látek.**

Tkáňová kultura pak neprodukuje látku vůbec nebo ve sníženém množství, popřípadě produkuje látku jinou.

3.2. MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ

Po převedení rostliny do tkáňové kultury se často stává, že tkáňová kultura neprodukuje žádanou látku vůbec nebo jen ve velmi nízké koncentraci, případně produkuje něco jiného. Aby se těmto situacím zabránilo, bylo vypracováno několik metod k ovlivnění produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami.

3.2.1. Morforegulace

Vzhledem k tomu, že anatomická a metabolická diferenciacie jsou často neoddělitelné, je třeba v takových případech zvyšovat produkci sekundárních metabolitů kultivací organizovaných pletiv. V současnosti lze pěstovat orgány a pletiva, v nichž jsou produkční buňky přítomny, ale mnohé vysoce specializované buňky, jako žlaznaté trichomy a mléčnice, ještě kultivovat nelze. [15]

Řízením morfogeneze můžeme navodit žádané metabolické dráhy. K morforegulačním zásahům se používají především rostlinné regulátory růstu. Např. u kultury *Digitalis purpurea* bylo dosaženo pomocí IAA růstu kořenů, v nichž docházelo k syntéze kardenolidů. [16]

Navození dediferenciacie rostlinného pletiva za účelem odvození tkáňové či suspenzní kultury v podmínkách *in vitro* způsobuje v celé řadě případů snížení produkce sekundárních metabolitů. Pokud dosáhne tkáňová kultura určitého stupně

diferenciace, může dojít ke zvýšení produkce. Kupříkladu digitoxin se tvořil pouze v kořenové kultuře Digitalis a morfinanové alkaloidy byly produkovány pouze, když se vytvářely tzv. latexové buňky. [17] Tropanové alkaloidy byly nalezeny také po indukci kořenů. [18]

Mnoho autorů připisuje schopnost syntézy určitému stupni diferenciace, kde prvním krokem je tzv. agregace buněk. V závislosti na stupni buněčné agregace bylo pozorováno zvýšení produkce purinových alkaloidů v Coffea arabica. [19]

3.2.2. Imobilizace

Jako velmi perspektivní se jeví využití imobilizovaných buněk, u nichž byla v některých případech (v porovnání s běžnými buněčnými kulturami) prokázána vyšší produkce sekundárních metabolitů. Výhodou je i jejich snazší využití pro kontinuální produkci žádaných látek. Imobilizace buněk spočívá v jejich uzavření do určitého inertního nosného materiálu.

Při *aktivní imobilizaci* se buňky uzavírají do polymerů, jako např. do agarů, alginátu sodného, polyakrylamidu či želatiny. K vlastní polymeraci, která pak vede k imobilizaci, dochází až po smíchání buněk s monomery. *Pasivní imobilizace* je založena na vcestování buněk do porézního materiálu, např. polyuretanové pěny. Možná je také vazba na povrch pevného nosiče, a to sorpcí či kovalentní vazbou. [4]

Jednotlivé typy nosičů mohou přímo ovlivňovat míru syntézy sekundárních metabolitů, např. alkaloidů – nejvyšší tvorba byla zaznamenána u buněk v alginátu. [20]

Po přidání prekurzorů tryptaminu a sekologaninu k imobilizovaným buňkám Catharanthus roseus v alginátu došlo ke zvýšení produkce ajmalicinu s následným uvolněním do média. [21]

Produkt uvolněný do média se ovšem stává možným inhibitorem syntézy sekundárního metabolitu na základě tzv. zpětnovazebného mechanismu. Byl pozorován inhibiční účinek kapsaicinu v médiu na další uvolňování metabolitu u imobilizovaných buněk rodu *Piper*. [22]

Inhibicí produktem je možné zabránit odebráním produktu z živného média, a to buď adsorpcí na iontoměničce nebo na aktivní uhlí. [3]

Výhody imobilizace lze shrnout následovně: [14]

- kontinuální uspořádání systému s možným uvolňováním metabolitů do média
- a jejich následným odstraňováním
- možnost snadné a rychlé obměny složek živného média
- jednoduchá technika imobilizace
- malé množství biomasy postačující k produkci
- možnost navození diferenciacie či agregace buněk
- zastabilizování vysoce produkčních linií
- ochrana buněk proti mechanickému poškození

Imobilizované buňky se mohou používat buď k de novo syntézám nebo k biotransformacím. [4]

3.2.3. Genové inženýrství

Jedná se o vnášení genů (transgeneze) do rostlinného genomu. Praktickým cílem je kromě vylepšování genomu kulturních rostlin vnášením genů pro šlechtitelsky významné vlastnosti také ovlivnění produkce farmakologicky aktivních sekundárních metabolitů. [23]

3.2.4. Ovlivnění ploidie buněk

Syntéza sekundárních metabolitů je často v úzkém vztahu k ploidii rostliny i tkáňové kultury. U intaktních rostlin je možné nalézt příklady závislosti kvantitativní (*Datura stramonium* tetraploid má 2–3krát více tropanových alkaloidů než diploid; *Atropa belladonna* tetraploid 1,5krát více než diploid [24]) i kvalitativní (*Urginea indica* di-, tetra- a hexaploid obsahují hlavně stigmasterol, kampesterol obsahuje pouze triploid [25]).

I v případech, kdy je explantát odebrán z rostliny o známé a pro produkci výhodné ploidii, je nutné počítat s tím, že pasážováním kultur ploidie často kolísá a spolu s tím klesá i morfogenetický potenciál a produkce. [10]

Hladina ploidie někdy ovlivňuje i rychlost růstu: polyploidní kalus roste i při zvýšené koncentraci auxinů pomaleji než diploidní. [26]

Ztráta regulačních mechanismů u haploida dovoluje zvýšit produkci primárních i sekundárních metabolitů, např. produkce nikotinu v tabákovém kalusu se zvyšovala při větším výskytu haploidních než diploidních buněk. [27]

3.2.5. Optimalizace kultivačních podmínek

Při optimalizaci kultivačních podmínek musíme brát v úvahu celou řadu faktorů, jejichž změna může ovlivnit biosyntetické možnosti dané kultury požadovaným směrem. Jedná se o úpravu složek živného média, pH, aerace, světla, teploty. Optimalizace je pro každý druh kultury specifická. [3]

Při hledání optimálních produkčních podmínek se použije některá ze základních půd a mění se koncentrace či forma jejich složek. V naprosté většině případů je nutné dodání energie v podobě *cukrů*, přičemž nejvýhodnější je použití sacharózy, a to

nejčastěji v koncentraci 3%. [10] Bylo zjištěno, že zvýšením obsahu sacharózy v živném médiu z 2 na 4% může být stimulována kumulace kyseliny rosmarinové v suspenzní kultuře *Coleus blumei* až 10krát. [28] Také organogeneze je vysoce energeticky náročná a pokud jí chceme v kultuře docílit, musíme zajistit dostatečnou koncentraci cukrů. Jejich dodáním je splněna i další podmínka – zvýšení osmotické aktivity prostředí. [29] Na druhou stranu zvýšení koncentrace sacharózy na 5-7% většinou negativně ovlivní růst a následně i produkci sekundárních metabolitů. [30]

Ta závisí především na *poměru obsahu uhlíku a dusíku* v médiu [31] a je potlačena zvýšeným množstvím dusíku – většinou bez ohledu na to, je-li dusík dodáván ve formě iontu amonného či dusičnanového. K výjimkám patří suspenze *Digitalis purpurea*, v níž je pro produkci digitoxinu optimální médium v poměru $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ = 3 : 1$. [32]

V případě, kdy sekundární metabolity dusík obsahují, jeho odstranění z média často sníží produkci, jako bylo prokázáno u alkaloidů z *Catharanthus roseus*. [33]

Vliv *fosfátů* na produkci sekundárních metabolitů se liší u jednotlivých druhů, avšak ve všech případech je určitá koncentrace PO_4^{3-} nezbytná pro růst.

Produkce sekundárních metabolitů je různě ovlivňována i dalšími složkami média: ionty vápníku, železa, draslíku, stopovými prvky a vitamíny. [10] Vliv mají i příměsi a nečistoty agaru. [34]

Optimální rozmezí *pH* je od 5,0 do 6,5. Vyšší nebo nižší způsobuje poruchy vývoje a růstu. [35] Navzdory tomuto tvrzení vedlo snížení pH na 3,5 v suspenzní kultuře *Lupinus polyphyllus* ke zvýšení produkce alkaloidů. [36]

Kultivační *teplota* je většinou zvolena empiricky v těsném rozmezí okolo 25°C, což vyhovuje většině kultur. [37] Bylo zjištěno, že produkce alkaloidů v tkáňové kultuře *Datura stramonium* je při 25°C vyšší než při 20°C. [38]

Suspenní kultury potřebují pro svůj optimální růst dodávání *kyslíku* do živného média, což je zajišťováno mícháním nebo provzdušňováním. Např. tvorba šikoninu je ovlivněna kromě vhodného složení média také dostatečným množstvím O₂. [39]

Růst rostlinných kultur, ale i biosyntéza a akumulace sekundárních metabolitů probíhají v závislosti na *světlo*. Syntézu berberinu v suspenzi *Coptis japonica* světlo zcela inhibovalo. [40] V mnoha případech je světlo stimulačním faktorem biotransformačních reakcí,[41] což může být způsobeno stimulací tvorby chloroplastů, v nichž probíhají některé metabolické reakce. [42]

Rostlinné buňky jsou při pěstování in vitro většinou striktně závislé na obsahu *růstových regulátorů* v živném médiu, protože syntéza endogenních fytohormonů často není pro zajištění růstu dostatečná. Účinek růstových regulátorů závisí na jejich typu, koncentraci, rostlinném druhu a klonu.

Největší vliv mají většinou auxiny. [10] Relativně častým inhibitorem je 2,4-D, neboť brání diferenciaci. Snižuje například syntézu nikotinu v buňkách *Nicotiana tabacum*. [43]

Téměř vždy má na sekundární metabolismus stimulační vliv IAA - v tkáňových buňkách *N. tabacum* podporuje syntézu alkaloidů. [31]

Účinky cytokininů na tvorbu sekundárních metabolitů nejsou příliš výrazné. V růstových i produkčních kulturách je nejčastěji používán kinetin, ten stimuluje např. tvorbu flavanolů u druhu *Eucalyptus*. [44]

Kyselina gibberelová působí na sekundární metabolismus často inhibičně. [10]

3.2.6. Mutace

Používá se celá řada chemických činidel a UV záření. Protože zásah do metabolismu je velmi komplexní, výsledky jsou často nepředvídané. Tímto způsobem bylo dosaženo zvýšení produkce sekundárních metabolitů u kultury *Panax ginseng*. [45]

3.2.7. Elicitace

Každá rostlinná buňka je schopna reagovat na stresy vnějšího prostředí uvolněním elicitorů z buněčných stěn patogenů či rostlin. [3]

Elicitory jsou látky biologického původu, které vyvolávají obrannou odpověď buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů. Příkladem takové obrané reakce vyvolané elicitory je tvorba fytoalexinů, které mají cytostatické, fungistatické a bakteriostatické účinky. Produkce sekundárních metabolitů může být vedle biotických elicitorů stimulována také elicitory abiotickými, jako je UV záření, chlad, vysoká teplota, soli těžkých kovů, změny pH apod. [4]

Při experimentální práci se často jako elicitory používají homogenáty inaktivovaných kultur mikroorganismů, např. přidáním extraktu patogena *Dendryphon* byla indukována syntéza sanguinarinu v kulturách druhu *Papaver*. Hladina alkaloidů se zvýšila 4 – 10krát oproti kontrole. [46] Produkce berberinu v *Thalictrum rugosum* byla indukována použitím polysacharidové frakce z kvasnic. [47]

Při vyhledávání vhodného elicitoru pro danou kulturu se většinou postupuje empiricky. [48]

Optimálního využití elicitoru lze dosáhnout pomocí těchto kritérií: [49]

- specifita a množství elicitoru
- doba kontaktu elicitoru s rostlinnou buňkou – např. v buněčné kultuře
Papaver somniferum byl pozorován efekt 3 hodiny po přidání elicitoru
- hloubka buněčné vrstvy v suspenzi, resp. kalusu
- doba trvání elicitace
- fáze růstu buněčné kultury – nejcitlivější na působení elicitoru je většinou v době růstové fáze [48]
- regulace růstu

Růstová fáze, ve které vystavíme tkáňovou kulturu působení elicitoru nemá vliv jen na množství akumulované látky, ale i na to, jaká látka se tvoří. Například elicitor Pythium stimuloval v 5 dní staré kultuře Catharanthus roseus tvorbu N-acetyltryptaminu, a v desetidenní kultuře se akumulovalo již celé spektrum monoterpen – indolových alkaloidů.

Poznatky o procesu elicitace, který podmiňuje tvorbu a akumulaci sekundárních přírodních látek v rostlinných tkáňových kulturách byly shrnuty do těchto bodů: [49]

- ✓ tvorba sekundárních metabolitů po působení elicitoru se vyskytuje především v buňkách na konci růstové fáze
- ✓ nastává v průběhu 12 – 48 hodin po působení elicitoru
- ✓ probíhá v suspenzi i v kalusu
- ✓ sekundární přírodní látky se nacházejí v buňkách i v médiu
- ✓ elicitaci je možné opakovat, aniž by došlo k poškození buňky

3.2.8. Transformace rostlinných buněk bakteriemi rodu

Agrobacterium

Existuje několik druhů půdních bakterií, které indukují morfogenetické změny rostlin, ovšem pouze u rodu *Agrobacterium* byl jednoznačně prokázán přenos specifických genů lokalizovaných na části velkého plazmidu do rostlinného genomu. Tato část plazmidu, zvaná T-DNA, obohacuje rostlinný genom o dva základní typy genů:

1. Geny pro nové cesty biosyntézy rostlinných hormonů, auxinů a cytokininů.

Ty způsobují dediferenciaci rostlinných buněk. Transformovaná pletiva rostou na půdě bez růstových látek.

2. Geny pro syntézu nádorově specifických látek, tzv. opinů a agrocipinů, které slouží jako zdroj uhlíku, fosforu, dusíku a energie pro ten typ bakterií, který transformaci indukoval. [3]

Pro využití transformovaných kultur k produkci sekundárních metabolitů hovoří řada výhod: [14]

- jsou geneticky a biochemicky stabilní
- vyznačují se rychlým růstem
- udržují si biochemickou kapacitu odpovídající mateřské rostlině
- jsou přístupné vnesení genetické informace
- možnost použití jednoho kultivačního média (růstové a produkční)

Transformace bakteriemi *Agrobacterium rhizogenes* byla využita ke zvýšení produkce sekundárních přírodních látek např. u tkáňových kultur druhů *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Panax ginseng* [50], ke zvýšení produkce pyridinových alkaloidů u různých druhů *Nicotiana* [51] a šikoninu u *Lithospermum erythrorhizon*. [52]

Pětinásobné zvýšení produkce bylo pozorováno u steroidních alkaloidů (solasodin) u kultury *Solanum aviculare* oproti kultuře in vitro. Zvýšení je porovnatelné s obsahem v nadzemní části intaktní rostliny. [53]

3.2.9. Biotransformace

Biotransformaci lze definovat jako přeměnu substrátu (prekurzoru) na produkt. Provádí se tak, že se ke kultuře přivádí prekurzory požadovaných sloučenin a po určitém čase se odebírají produkty transformace. [54]

Jako substráty pro biotransformace se mohou využívat: [55]

- a) látky rostlině obvykle nedostupné, tj. syntetické látky, chemické analogy či sekundární metabolity jiných druhů rostlin, jejichž transformaci lze vysvětlit jako detoxikační reakci, např. kultura *Panax ginseng* byla schopna syntetizovat arbutin, přestože se v této rostlině nikdy nevyskytoval [56]
- b) „přirozené substráty“, tj. látky běžně se v rostlinách vyskytující, příkladem může být hydroxylace digitoxinu na digoxin buňkami *Digitalis lanata*. [57]

Pro zabudování prekurzoru do žádaného produktu byly definovány následující podmínky: [58]

1. Přítomnost enzymu schopného inkorporace prekurzoru.
2. Produkt musí být tvořen rychleji než je metabolizován.
3. Kultura musí dodávaný prekurzor tolerovat.

V mnoha případech vede dodání exogenních prekurzorů ke zvýšení biosyntézy produktu, na druhé straně ale u mnoha kultur zůstane přidání prekurzorů bez odezvy.

V případě použití prekurzorů je nutno ověřit jejich akceptovatelnost, zjistit jejich optimální hladinu, kdy působí a aplikovat je přesně v té růstové fázi, kdy jsou účinné, protože některé kultury produkují požadované metabolity v pozdní stacionární fázi, jiné v lag-fázi nebo rané exponenciální fázi růstu. Kupříkladu bylo zjištěno, že u tkáňové kultury *Arctostaphylos uva-ursi* je výhodnější podání prekurzoru v průběhu stacionární fáze růstu kultury, protože aplikace na počátku exponenciální fáze částečně inhibovala růst. [59]

Biotransformace může být realizována i kulturou, v níž je celá biosyntetická sekvence porušena, ale enzym schopný zprostředkovat žádanou dílčí reakci je tvořen v dostatečném množství, což má zásadní význam ve farmaceutickém průmyslu. Tento přístup může usnadnit přípravu nových analogů známých léčiv, která by měla zvýšený terapeutický účinek či sníženou toxicitu. [54] Příkladem může být konverze 3-demethylthiocolchicinu na thiocolchicosid u suspenzní kultury *Centella asiatica*. Thiocolchicosid vykazuje analgetické a myorelaxační účinky a díky glykosylaci dojde ke zvýšení jeho rozpustnosti ve vodě a snížení toxicity. [60]

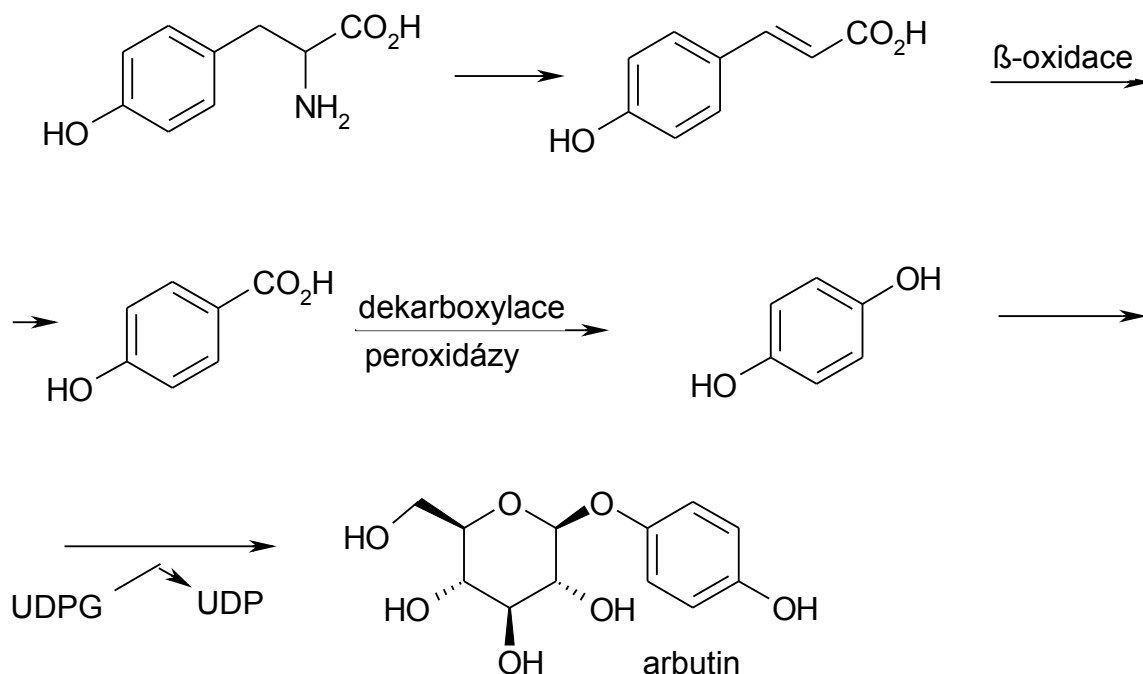
Výhodou rostlinných enzymů je to, že jsou schopny katalyzovat regio- a stereospecifické reakce. Například bylo zjištěno, že tkáňové kultury *Peganum harmala* mají schopnost stereoselektivně hydrolyzovat racemický phenylethylpropionát. [61] Tyto enzymy proto mohou být použity k produkci sloučenin farmaceutického zájmu. Příkladem je vysoce opticky čisté antimalarikum artemisinin, získaný z *Artemisia annua*. [62]

3.3. ARBUTIN

Arbutin je rostlinný sekundární metabolit patřící do skupiny fenolických glykosidů. Je obsahovou látkou drogy Folium uvae-ursi. Matečnou rostlinou je *Arctostaphylos uva-ursi* (L.), česky medvědice lékařská z čeledi Ericaceae. Pro glykosidy je charakteristické, že se skládají z necukerné (aglykon, genin) a cukerné části. Aglykon arbutinu tvoří hydrochinon, cukernou složkou je D-glukóza. [63]

Arbutin je syntetizován vyššími rostlinami z tyrozinu přes kyselinu p-kumarovou a 4-hydroxybenzoovou, která přechází oxidativní dekarboxylací a glukosylací na arbutin. [64]

Obr. č. 1.: Biosyntéza arbutinu [59]



Terapeutické využití: arbutin se používá jako dezinficiens močových cest, je součástí diuretických a urologických čajových směsí (*Species urologicae Planta*). [63] Antimikrobiální účinnost arbutinu je závislá na uvolnění hydrochinonu z molekuly, a to autocidním působením patogenních bakterií na látku. Byla zjištěna přímá závislost antibakteriálního působení arbutinu na stupni β -glukosidázové aktivity mikroorganismů. [65] Byl také potvrzen antitusický efekt arbutinu, který se blížil účinku kodeinu v dávce 10 mg/kg i.p. [66]

Zjistilo se, že arbutin spolu s aloesinem způsobuje inhibici tyrozinázové aktivity lidských melanocytů a signifikantně redukuje obsah melaninu. [67] Ještě větší inhibiční účinek než α -arbutin vykazovaly jeho α -glykosidy maltosid a maltotriosid získané transglykosylační reakcí z cyklomaltodextrinu pomocí glucanotransferázy. [68] Inhibici tyrozinázové aktivity vyvolal také deoxyarbutin. Tyto sloučeniny by mohly být využity v dermatologii k léčbě hyperpigmentovaných lézí. [69]

Možnost získání z tkáňových kultur: arbutin transformují buněčné systémy jako *Datura innoxia*, *Catharanthus roseus* nebo *Rauwolfia serpentina* z hydrochinonu. Ačkoli se může arbutin snadno chemicky připravit pomocí tří kroků, jednokroková biosyntéza je stále zájmem biotechnologie. [70] Je popsána tvorba arbutinu z hydrochinonu s maximálním výtěžkem 9,2 g/l média jako jediné sloučeniny vytvořené za 4 dny kultivovanými buňkami rodu *Catharanthus*. [71] Při přeměně v buněčné kultuře *Rauwolfia serpentina* s použitím vyživovacího média optimalizovaného pro produkci glukoalkaloidu raucaffricinu byl zjištěn produkční podíl arbutinu do 18 g/l po 7 dnech kontinuálního podávání hydrochinonu. [72]

Byla zkoumána produkce arbutinu ve tkáňových kulturách *Bellis perennis* L., *Bergenia crassifolia* L. Fritsch, *Brassica oleracea* var. *capitata* L., *Coronilla varia* L.,

Leonurus cardiaca L., *Leuzea carthamoides* DC., *Rheum palmatum* L., *Rhodiola rosea* L. a *Datura meteloides* DC. po přidání prekurzorů hydrochinonu, 4-hydroxybenzoové kyseliny a tyrozinu do živného média. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při transformaci hydrochinonu a kyseliny 4-hydroxybenzoové na arbutin u tkáňové kultury *Datura meteloides* a při transformaci tyrozinu na arbutin u tkáňové kultury *Rhodiola rosea*. [73]

Předmětem studií byla také biotransformace arbutinu a 4-methoxyfenolu, a to u kultur *Bellis perennis*, *Coronilla varia*, *Rhodiola rosea*, *Datura meteloides*, *Leuzea carthamoides* a *Bergenia crassifolia*. Transformace arbutinu na methylarbutin proběhla u suspenzní kultury *Leuzea carthamoides*, stejně jako přeměna 4-methoxyfenolu na methylarbutin. Při přeměně 4-methoxyfenolu na arbutin u kultury *Leuzea carthamoides* a *Datura meteloides* nebyly v analyzovaném vzorku nalezeny žádné stopy hydrochinonu. Z toho vyplývá, že se arbutin pravděpodobně vytvořil demetylací methylarbutinu. [74]

Arbutin může být také syntetizován tkáňovou kulturou *Panax ginseng*, přestože se v tomto rostlinném rodě normálně nevyskytuje. [56]

Vliv cukrů na glykosylaci exogenního hydrochinonu byl studován na suspenzní kultuře *Catharanthus roseus*. Produkce arbutinu byla zesílena 2 – 3× sacharózou nebo glukózou v koncentraci do 6%, přičemž toto zesílení bylo přímo závislé na koncentraci cukru. [75]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. PŘÍSTROJE

- laboratorní analytické váhy AND Helago s.r.o.
- přesné váhy Kern 572
- horkovzdušný sterilizátor Chirana IP 21
- box s laminárním prouděním Holten LaminAir (HV MINI)
- sušárna Memmert
- Silufo[®] UV 254 sklárny Kavalier, závod Votice
- UV lampa CAM AG
- UV/VIS detektor PU 4110 Philips
- multichannel detektor DAD PU 4021 Philips
- pumpa PU 4110 Philips
- předkolona 30×3 mm CGC SGX C₁₈, velikost částic 10 μm (Tessek Praha)
- kolona 250×4 mm Purospher Star RP-18 endcapped, velikost částic 5 μm (Merck, Darmstadt)

4.2. CHEMIKÁLIE

- 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, Merck
- N⁶-benzyladenin, Merck
- 4-methoxyfenol, Fluka AG
- kyselina p-kumarová, Sigma-Aldrich

- arbutin pro laboratorní účely, Roth
- methylarbutin izolovaný na katedře farmaceutické botaniky a ekologie
- hydrochinon p.a., Lachema
- kyselina 4-hydroxybenzoová krist. reinst. (cryst. research grade), Serva
- 4-aminoantipyrin čistý, Chemapol
- hexakynoželezitan draselný p.a., Lachema
- amoniak vodný roztok min. 25% p.a., Lachema
- methanol p.a., Lachema
- chloroform p.a., Lachema
- methanol gradient grade for liquid chromatography
- ethanol 96%
- glycin p.a., Lachemie
- kyselina nikotinová čistá, Lachema
- thiamin hydrochlorid B.P., U.S.P., Koch-Light Laboratories Ltd.
- pyridoxin hydrochlorid DAB 6, Loba Chemie
- L-tyrosin, Serva
- kyselina chlorovodíková, Lachema
- myo-inositol, Sigma
- hydrolyzát kaseinu, Sigma
- sacharosa p.a., Lach-Ner
- agar noble difco laboratories, Detroit

4.3. POUŽITÝ BIOLOGICKÝ MATERIÁL

K biotransformačním pokusům byly použity dlouhodobě udržované tkáňové kultury z úžlabních pupenů *Centella asiatica* (26.-31. pasáž), dodané ze zahrady léčivých rostlin při Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy.

Ke kultivaci kultur bylo použito živné médium dle Murashigeho a Skooga [76] s přísadkou regulátorů růstu 2,4 D (0,5 mg/l) a BA (0,5 mg/l).

4.4. BIOTRANSFORMAČNÍ POKUSY

Biotransformační pokusy byly prováděny jak v suspenzních kulturách, tak v kulturách kultivovaných na můstcích z filtračního papíru v tekutém živném médiu. Kultivace probíhala za světla.

Po 14 dnech kultivace kultur u můstkové metody a ihned po založení suspenzních kultur byly do živného média sterilně přidány v koncentraci 100 mg/l tyto prekurzory arbutinu:

- hydrochinon
- tyrozin
- kyselina 4-hydroxybenzoová
- kyselina p-kumarová

Vzorky kalusů pro analýzu byly odebrány po 6, 12, 24, 48 a 168 hodinách v případě suspenzních kultur a po 12 a 48 hod. při kultivaci na můstcích. Analýzy byly provedeny rovněž u slepých pokusů (bez přidání prekurzorů) a vzorků živných médií.

4.5. ANALÝZA OBSAHOVÝCH LÁTEK

Příprava extraktu

Kalusy byly sušeny při pokojové teplotě na skleněných Petriho miskách, rozetřeny v třecí misce a navážka o hmotnosti cca 0,250 g byla extrahována 5 ml ethanolu 96% za studena po dobu 48 hodin. Extrakt byl následně zfiltrován a odpařen a byla provedena ztráta sušením. [77]

TLC

Analýza byla provedena na deskách Silufol® a Silikagel 60 Merck, vyvíjecí soustava byla směs chloroformu a methanolu (75:25).

Detekce

Postřík: I. 1. 4-aminoantipyrinem (4-AA) - 0,02 M vodný roztok

2. 20% vodným roztokem amoniaku

3. 1% vodným roztokem $K_3Fe(CN)_6$

II. směsí 1% ethanického roztoku $FeCl_3$ a 1% vodného roztoku

$K_3Fe(CN)_6$

Po vyvinutí chromatogramu byla před detekcí methylarbutinu prováděna hydrolýza postříkem 1M HCl a zahřátím v sušárně po dobu 15 minut při 105°C a pak alkalizace 20% amoniakem.

Standardy

Methanické 0,1% roztoky hydrochinonu, arbutinu, methylarbutinu a 4-methoxyfenolu.

HPLC

Specifikace přístroje: pumpa: PU 4110

detektor: PU 4110 UV/VIS

DAD PU 4021 multichannel detektor

nástřiková klička: 20 µl, manuální nástřik

kolona: 250×4 mm SGX C₁₈, velikost částic 7 µm (Merck)

předkolona: 30×3 mm CGC SGX C₁₈, velikost částic 10 µm

(Merck)

Vzorky byly rozpuštěny v 1 ml ethanolu.

Analýza:

- eluce gradientová, methanol : voda v poměru 5 : 95 s lineárně se zvyšujícím poměrem methanolu až na 95 : 5 v průběhu 15 minut
- průtoková rychlost mobilní fáze 1,5 ml/min.
- nástřik 20 µl
- detektor UV/VIS PU 4110, monitorovaná vlnová délka 285 nm

5. VÝSLEDKY

Zkratky použité v tabulkách:

A.....arbutin

MA.....methyларbutin

HCH.....hydrochinon

4-MF.....4-methoxyfenol

5.1. VÝSLEDKY TLC ANALÝZY

Tab. 1: Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci suspenzních kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu – hydrochinonu a kyseliny p-kumarové v konc. 100 mg/l

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
6 h	–	–	+	+	–	–	–	–
12 h	–	–	–	–	–	–	–	–
24 h	–	–	–	–	–	–	–	–
48 h	–	–	–	–	–	–	–	–
168 h	–	–	–	–	–	–	–	–
PREKURZORY	hydrochinon				kys. p-kumarová			

Tab. 2: Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci suspenzních kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu – tyrozinu a kys. 4-hydroxybenzoové v konc. 100 mg/l.

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
6 h	–	–	–	–	–	–	+	+
12 h	–	–	–	–	–	–	–	–
24 h	–	–	–	–	–	–	–	+
48 h	–	–	–	–	–	–	+	+
168 h	–	–	–	–	–	–	–	+
PREKURZORY	tyrozin				kys. 4-hydroxybenzoová			

Tab. 3: Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci můstkových kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu - hydrochinonu a kys. p-kumarové v konc. 100 mg/l.

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
12 h	–	–	+	–	–	–	–	–
48 h	–	–	–	–	–	–	–	–
PREKURZORY	hydrochinon				kys. p-kumarová			

Tab. 4: Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci můstkových kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu – tyrozinu a kys. 4-hydroxybenzoové v konc. 100 mg/l.

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
12 h	–	–	+	–	–	–	–	–
48 h	–	–	–	–	–	–	–	+
PREKURZORY	tyrozin				kys. 4-hydroxybenzoová			

Tab. 5: Výsledky TLC analýzy extraktů suspenzních kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu – hydrochinonu a kys. p-kumarové v konc. 100 mg/l.

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
6 h	+	–	–	–	–	–	–	–
12 h	+	–	–	–	–	–	–	–
24 h	+	–	–	–	–	–	–	–
48 h	+	–	–	–	–	–	–	–
168 h	+	–	–	–	–	–	–	–
PREKURZORY	hydrochinon				kys. p-kumarová			

Tab. 6: Výsledky TLC analýzy extraktů suspenzních kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu – tyrozinu a kys. 4-hydroxybenzoové v konc. 100 mg/l.

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
6 h	–	–	–	–	+	+	–	–
12 h	–	–	–	–	+	+	–	–
24 h	–	–	–	–	+	+	–	–
48 h	–	–	–	–	+	–	–	–
168 h	–	–	–	–	+	+	–	–
PREKURZORY	tyrozin				kys. 4-hydroxybenzoová			

Tab. 7: Výsledky TLC analýzy extraktů z kalusů můstkových kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu – hydrochinonu a kys. p-kumarové v konc. 100 mg/l.

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
12 h	+	–	–	–	–	–	–	–
48 h	+	–	–	–	–	–	–	–
PREKURZORY	hydrochinon				kys. p-kumarová			

Tab. 8: Výsledky TLC analýzy extraktů z kalusů můstkových kultur *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu – tyrozinu a kys. 4-hydroxybenzoové v konc. 100 mg/l.

DOBA ODBĚRU	SLEDOVANÉ LÁTKY							
	A	MA	HCH	4-MF	A	MA	HCH	4-MF
12 h	–	–	–	–	–	–	–	–
48 h	–	–	–	–	–	–	–	–
PREKURZORY	tyrozin				kys. 4-hydroxybenzoová			

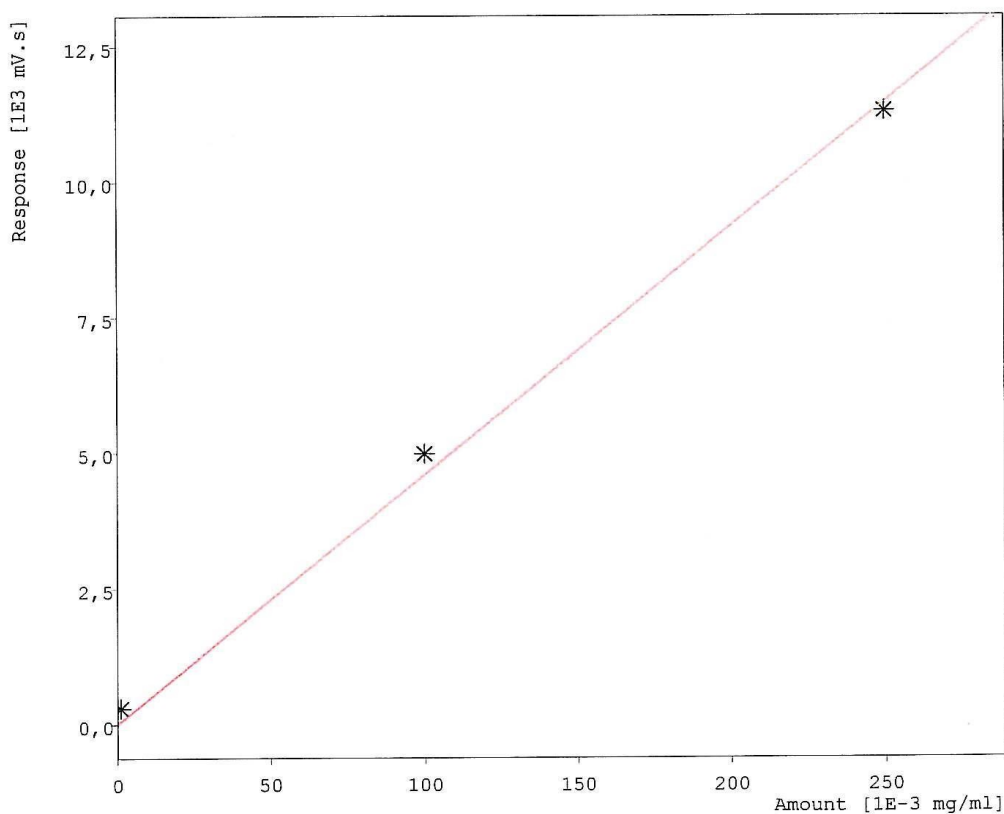
5.2. VÝSLEDKY HPLC ANALÝZY

arbutin - 5,968 min.

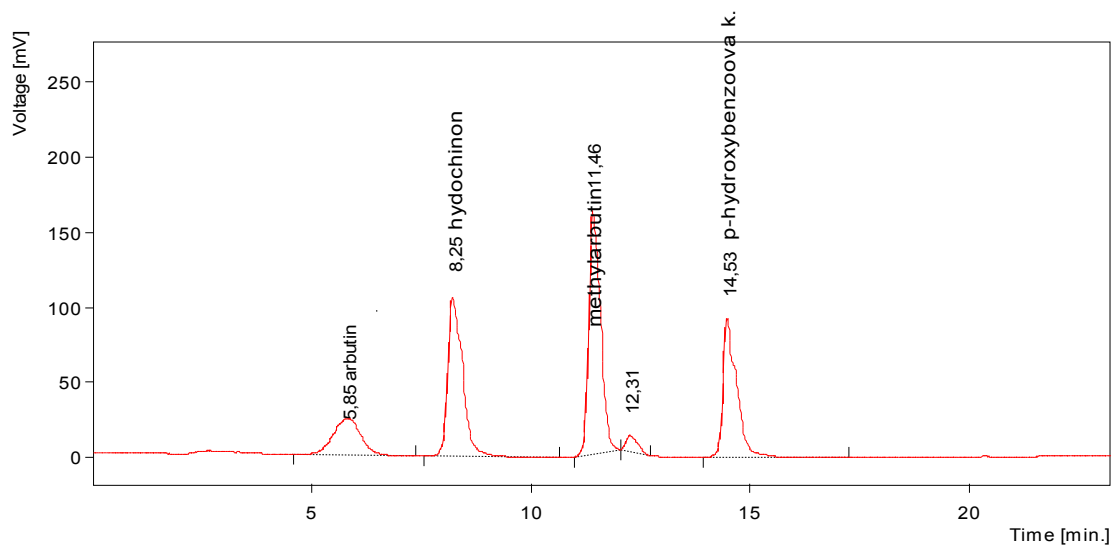
Substance Levels

Peak Type : **Ordnr**
 Left Window : **0,6 min.**
 Right Window : **0,6 min.**
 Response Base : **Area**
 Curve Fit Type : **Linear**
 Zero Type : **Curve from Zero**
 Subst. Equation : **Y = 45854,1 * X**
 Correlation Coef. : **0,999354**
 Saved Resp. Fact. : **0,00002345**

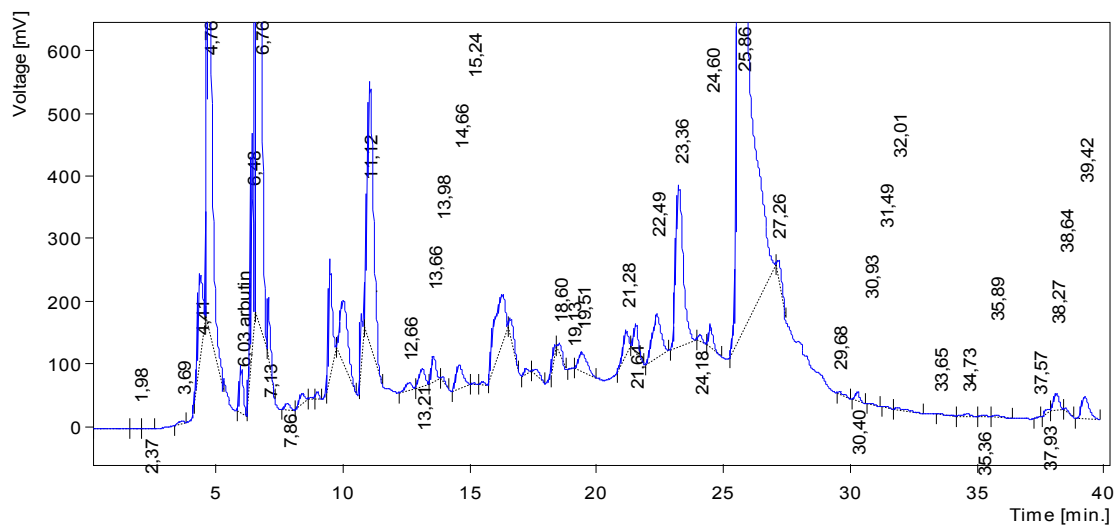
Lv	Response	Amount	Lvl Res Factor
1	11306,1638	2,500E-01	2,2E-05
2	4976,4523	1,000E-01	2,0E-05
3	282,1542	1,000E-03	3,5E-06
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0



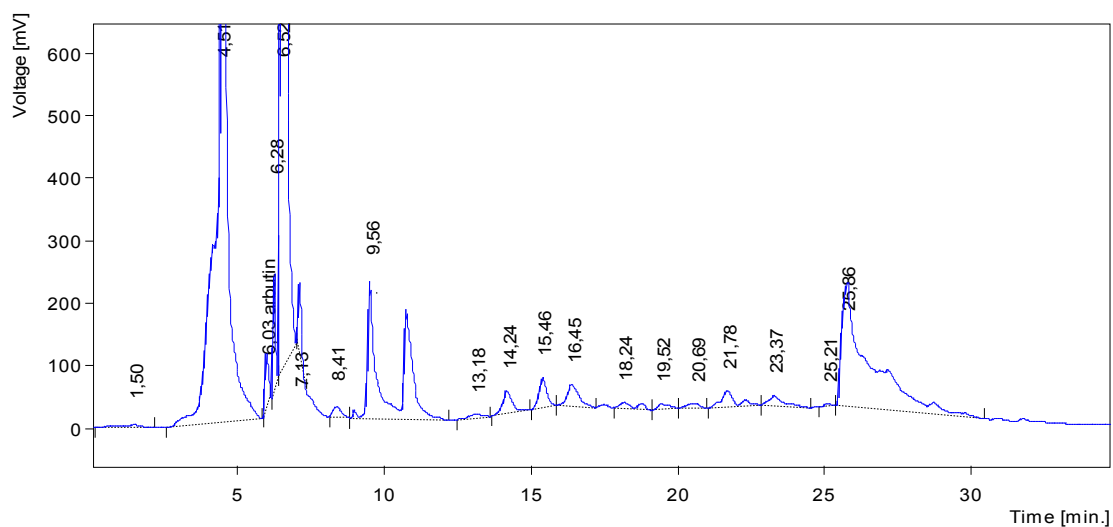
Obr. 1: Kalibrační křivka arbutinu



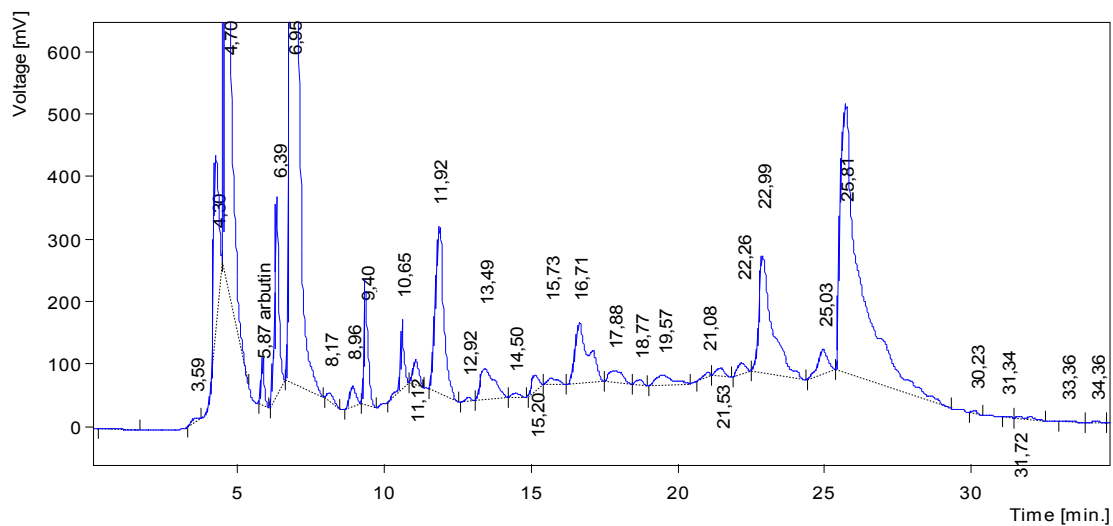
Obr. 2: HPLC analýza **standardů**: arbutinu, hydrochinonu, methylarbutinu a 4-hydroxybenzoové kyseliny



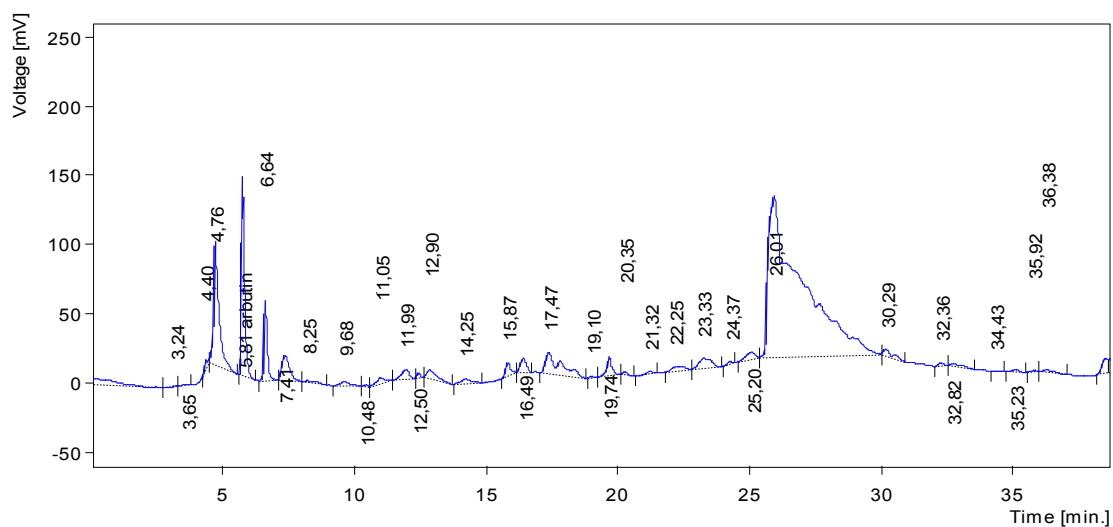
Obr. 3: HPLC analýza suspenzní kultury *Centella asiatica* – prekurzor hydrochinon (100 mg/l), interval odběru 6 hodin



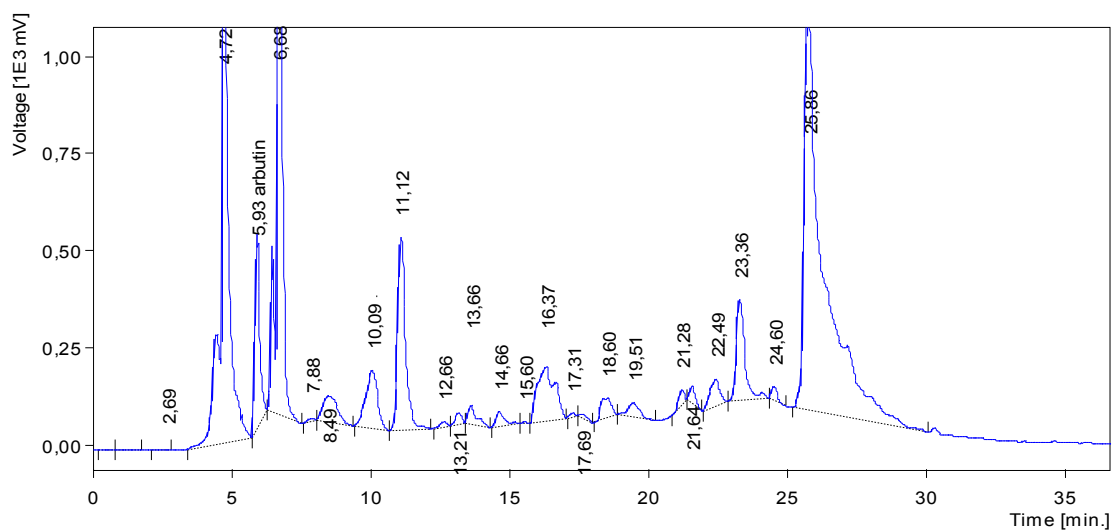
Obr. 4: HPLC suspenzní kultury *Centella asiatica* – prekurzor hydrochinon (100 mg/l), interval odběru 12 hodin



Obr. 5: HPLC suspenzní kultury *Centella asiatica* – prekurzor hydrochinon (100 mg/l), interval odběru 24 hodin



Obr. 6: HPLC suspenzní kultury *Centella asiatica* – prekurzor hydrochinon (100 mg/l), interval odběru **48** hodin

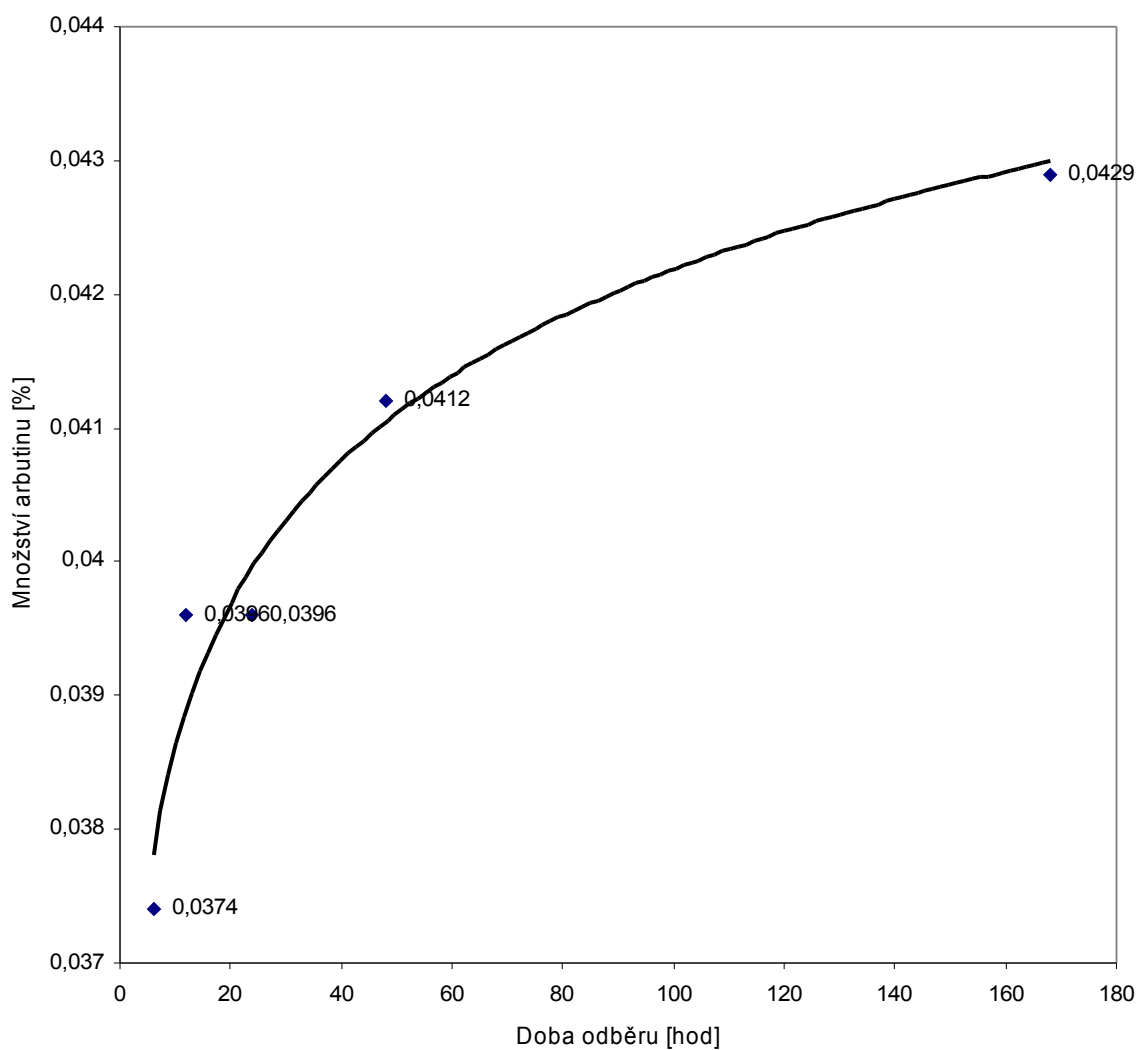


Obr. 7: HPLC suspenzní kultury *Centella asiatica* – prekurzor hydrochinon (100 mg/l), interval odběru **168** hodin

Doba odběru (h)	Množství arbutinu (%)
6	0,0374
12	0,0396
24	0,0396
48	0,0412
168	0,0429

Tab. 9: Výsledky HPLC analýzy extraktů suspenzních kultur *Centella asiatica* po přidání hydrochinonu v

koncentraci 100 mg/l.



Obr. 8: Graf závislosti množství arbutinu v extraktu suspenzní kultury *Centella asiatica* po přidání hydrochinonu v koncentraci 100 mg/l na délce kultivace (6, 12, 24, 48 a 168 hodin)

6. DISKUZE

Na katedře farmaceutické botaniky a ekologie probíhá již řadu let výzkum týkající se produkce terapeuticky významných sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami různých druhů rostlin. Zkoumají se možnosti, jak tuto produkci co nejlépe žádoucím způsobem ovlivnit.

Mým úkolem bylo ověření biotransformačních schopností tkáňové kultury *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu hydrochinonu, tyrozinu a kyseliny *p*-hydroxybenzoové a *p*-kumarové v koncentraci 100 mg/l. Výzkum se týkal jednak suspenzních tkáňových kultur, jednak tkáňových kultur kultivovaných na můstcích z filtračního papíru v tekutém živném médiu a probíhal za světla.

Vzorky kalusů a médií pro analýzu byly odebírány v určitých časových intervalech od aplikace exogenních prekurzorů. U suspenzních kultur po 6, 12, 24, 48 a 168 hodinách a v případě můstkových kultur po 12 a 48 hodinách - jedná se o doplnění chybějících časových intervalů z předchozích pokusů kolegyně Vránové. [78] Kvalitativní důkaz sledovaných metabolitů byl proveden pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) a kvantitativní hodnocení bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Metodou TLC byla u suspenzní kultury *Centella asiatica* prokázána přítomnost arbutinu v kalusu ve všech sledovaných intervalech od přidání exogenního prekurzoru hydrochinonu (tab. 5). Proběhlou biotransformaci hydrochinonu dokazuje také to, že nebyl přítomen v extraktu ani v půdě (tab. 1, 5). Kultura tedy všechn hydrochinon zužitkovala, na rozdíl od tkáňové kultury *Datura meteloides* a *D. innoxia*, jejichž transformační schopnosti byly zkoumány na katedře v předchozích letech. U těchto kultur byla spotřebována jen část hydrochinonu. [79]

Analýza pomocí HPLC výskyt arbutinu po přidání hydrochinonu u suspenzních kultur potvrdila. Bylo zjištěno, že se množství vytvořeného arbutinu zvyšuje s délkou působení prekursoru (obr. 8). Maximum arbutinu bylo nalezeno po 168 hodinách, a to 0,0429%. Maximum arbutinu po 168 hodinách od přidání prekursoru hydrochinonu bylo zjištěno rovněž u kultury *Datura meteloides* při biotransformačních pokusech na katedře farm. botaniky a ekologie. Množství arbutinu bylo však několikanásobně vyšší (7,4%) než u kultury *Centella asiatica*, na které jsem prováděla pokusy já, kolegyně Vránová a kolega Kostřiba. Takto vysoké procento arbutinu nebylo na katedře farm. botaniky a ekologie získáno žádnou jinou kulturou. [73]

Co se týče jiných vědeckých pracovišť, tak Inomata se svými kolegy dosáhl transformace hydrochinonu na arbutin u suspenzních kultur *Catharanthus roseus* s výtěžkem 9,2 g/l po 4 dnech od přidání prekursoru. [71] Další pozitivní výsledky byly popsány u suspenzních kultur *Rauwolfia serpentina* s maximem produkce arbutinu 18 g/l po týdenním kontinuálním podávání hydrochinonu. [72]

Při srovnání výsledků práce mé a mého kolegy Kostřiby, který aplikoval prekursor v koncentraci 200 mg/l, nebyl pomocí HPLC shledán významný rozdíl v množství arbutinu, který se vytvořil v kalusech po přidání hydrochinonu. Pouze maximum produkce nastalo při použití prekursoru ve vyšší koncentraci již po 24 hodinách. [80]

Při použití dalších prekursorů, tj. tyrozinu, kyseliny 4-hydroxybenzoové a p-kumarové nebyla metodou HPLC přítomnost arbutinu potvrzena. V předchozích pokusech byla kyselina 4-hydroxybenzoová transformována na arbutin kulturami *Bellis perennis*, *Bergenia crassifolia*, *Brassica oleracea*, *Coronilla varia*, *Leonurus cardiaca*, *Leuzea carthamoides*, *Rheum palmatum*, *Rhodiola rosea* a *Datura meteloides*. Tytéž kultury transformovaly na arbutin také tyrozin. [73]

Mé experimenty prováděné na můstkových kulturách navazují na práci Marie Vránové, která ověřovala biotransformační schopnosti *Centella asiatica* po přidání prekurzorů arbutinu v konc. 100 a 200 mg/l v intervalech odběru 6, 24 a 168 hodin. Pomocí HPLC potvrdila přítomnost arbutinu jako produktu transformace hydrochinonu ve všech sledovaných intervalech odběru a u obou koncentrací s maximem produkce po týdenní kultivaci při koncentraci hydrochinonu 200 mg/l (0,504%). [78]

V mém případě, při použití dalších časových intervalů (12 a 48 hodin), HPLC neprokázala přítomnost arbutinu po aplikaci hydrochinonu ani jiného prekurzoru (tyrozinu, kyseliny p-kumarové a 4-hydroxybenzoové). Příčinou může být to, že se stárnutím použitých kultur dochází velmi často k poklesu jejich biotransformačních schopností.

Metodou HPLC byla tedy prokázána pouze biotransformace hydrochinonu na arbutin v suspenzních kulturách. Důvodem je pravděpodobně to, že je zde médium, obsahující prekurzor, ve styku s celým povrchem kultury, na rozdíl od můstkových kultur, kde médium vzlíná filtračním papírem, který se dotýká pouze baze kalusu. Při srovnání výtěžků časových intervalů je zřejmé, že při aplikaci hydrochinonu v koncentraci 100 mg/l množství vytvořeného arbutinu stoupá s maximem po týdenní kultivaci (0,0429%), zatímco při použití dvojnásobné koncentrace tohoto prekurzoru je maxima produkce dosaženo již po 24 hodinách (0,043%) a dále pozvolna klesá. Kultura je zřejmě schopná transformovat větší množství hydrochinonu než 100 mg/l. Dalšího zvýšení produkce arbutinu by bylo možné dosáhnout použitím ještě vyšší koncentrace hydrochinonu, pokusy na nově odvozené mladší kultuře, event. změnami ve složení živného média.

7. ZÁVĚR

1. Byla prokázána schopnost suspenzní kultury *Centella asiatica* glykosylovat hydrochinon na arbutin.
2. Ostatní přidávané prekurzory neprokázaly žádné biotransformační změny.
3. Arbutin byl detekován TLC a HPLC analýzou, a to ve všech sledovaných časových intervalech odběru s maximem po týdenní kultivaci ($0,429 \cdot 10^{-1}\%$).
4. Biotransformační schopnost mŕstkových kultur potvrzena nebyla.
5. Přítomnost arbutinu ani jiného sledovaného metabolitu nebyla zjištěna v žádném ze sledovaných médií.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. OPATRŇY, Z.: Množení a šlechtění rostlin metodou explantátových kultur. Zemědělská škola 35 (6), 82, 1985
2. JAHODÁŘ, L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty. Univerzita Karlova, Praha 1995
3. PARTLOVÁ, I.: Studium druhu *Drosophyllum lusitanicum* Link. v kultuře in vitro a možnosti produkce naftochinonového derivátu plumbaginu. (Disertační práce), Univerzita Komenského, Farmaceutická fakulta, Bratislava 1995
4. KOVÁČ, J.: Explantátové kultury rostlin. Univerzita Palackého, Olomouc 1995
5. CHARLEWOOD, B.V., RHODES, M.J.C.: Secondary products from plant tissue culture. Clarendon Press, Oxford 1990, p. 5 – 30, 143 – 145, 206, cit. dle [3]
6. VANĚK, T.: Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami vyšších rostlin. Chem. listy 83, 288, 1989
7. SUDHA, G., RAVISHANKAR, G.A.: Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolite events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. Plant cell tissue organ cult. 71, 181, 2002
8. MÜHLBACH, H.P.: Use of plant cell cultures in biotechnology. Biotechnol. Ann. Rev. 4, 113, 1998
9. BAREŠOVÁ, H.: Produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách rostlin. Biol. listy 51, 103, 1986

10. MENDE, P., WINK, M.: Uptake of the quinolizidine alkaloid lupanine by protoplasts and vacuoles of *L. polyphyllus* cell susp. cultures. *J. Plant Physiol.* 129, 229, 1987
11. NOGUCHI, H., SANKAWA, U.: In Abstr. Intern. Congress Plant Tissue Cell Culture, Tokyo 1982, p. 185, cit. dle [9]
12. KARTING, T.: Cardiac glycosides in cell cultures of *Digitalis*. In Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), *Plant tissue culture and its bio-technological application*, Springer Verlag, Berlin 1977, p. 44
13. BÖHM, H.: *Biol. Rundschau* 19, 138, 1981, cit. dle [9]
14. TACHIBANA et al.: Formation of taxol in *Taxus cuspidata* Sieb et Zucc. var *Nana* Redher callus cultures. *Mokuzai Gakkaishi* 40, 1254, 1994, cit. dle [3]
15. SEABROOK, J.E.A.: In Staba, J. E.(ed.), *Plant tissue culture as a source of biochemicals*, CRC Press, Boca Raton 1980, p. 1
16. RÜCKER, W., JENTZSCH, K., WICHTL, M.: *Z Pflanzephyiol.* 102, 207, 1981, cit. dle [9]
17. RUSH, M.D., KUTCHAN, T.M.: Correlation of the appearance of morphinan alkaloids and laticifer cells in germinating *Papaver bracteatum* seedlings. *Plant Cell. Rep.* 4, 241, 1985
18. HAMILTON, R.M. et al.: *Biotech. Bioeng. Symp.* 17, 685, 1986, cit. dle [3]
19. ROKEM, J.S., GOLDBERG, I.: *Adv. Biotechnol. Processes* 4, 241, 1985, cit. dle [3]
20. BRODELIUS, P.: In Abstr. V. Intern. Congress Plant Tissue Cell Culture, Tokyo 1982, p. 79, cit. dle [9]

21. BRODELIUS, P. et al.: Febs Lett. 103, 93, 1979. In: Tanaka, A., Nakajima, H.: Application of immobilized growing cells, Biotechnology 42, 97, 1990, cit. dle [3]
22. LINDSEY, K., YEOMAN, M.M.: In plant cell culture technology. Bot. Monographs 23, 1986, cit. dle [3]
23. SAITO, K. et al.: Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides. Plant Cell Rep. 9, 121, 1990
24. LEWIS, W.H.: Polyploidy. Plenum Press, New York 1980, p.103
25. JHA, S., SEN, S.: Bufadienolides in different chromosomal races of Indian squill. Phytochemistry 20, 1442, 1981
26. LEWIS, W.H.: Polyploidy. Plenum Press, New York 1980, p. 61
27. MEHTA, A.R.: In Abstr. V. Intern. Congress Plant Tissue Cell Culture, Tokyo 1982, p. 56, cit.dle [9]
28. PETERSEN, M.: New Aspects of Rosmarinic Acid Biosynthesis in Cell Cultures of *Coleus blumei*. 40th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Trieste, 1.-5.9.1992. Planta Med. 58, Suppl.7, 578, 1992
29. THORPE, T.A.: Frontiers of plant tissue culture. Univ. Calgary, Calgary 1980, p. 49
30. DOUGALL, D.K.: In Staba, J.E. (ed.), Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Raton 1980, p. 21
31. TABATA, M.: Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures. In Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Plant tissue culture and its bio-technological application, Springer Verlag, Berlin 1977, p. 3

32. HAGIMORI, M., MATSUMOTO, T., OBI, Y.: In Abstr. V. Intern. Congress Plant Tissue Cell Culture, Tokyo 1982, p. 180, cit.dle [9]
33. MACCARTHY, J.J. et al.: Exp. Bot. 31, 1315, 1980, cit.dle [9]
34. ROMBERGER, J.A., TABOR, C.A.: Amer. J. Bot. 58, 131, 1971, cit.dle [9]
35. PIERIK, R.L.M.: In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publisher, The Netherlands 1987, p. 50, cit.dle [3]
36. WINK, M.: Metabolism of Quinolizidine Alkaloids in Plants and Cell Suspension Cultures : Induction and Degradation. In: Neumann, K.H., Barz, W., Reinhard, E. (eds.), Primary and secondary metabolism of plant cell cultures, Springer Verlag, New York 1985, p. 107
37. MARTIN, S.M.: In Staba, J.E. (ed.), Plant tissue culture as a source of biochemicals, CRC Press, Boca Raton 1980, p. 143
38. SALEH, M.M., KAMAK, M.R.: In Abstr. V. Intern. Congress Plant Tissue Cell Culture, Tokyo 1982, p. 183, cit.dle [9]
39. HARA, Y., MORIMOTO, T., FUJITA, Y.: Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Rep. 6, 8, 1986
40. YAMADA, Y., SATO, F.: Production of berberine in cultured cells of *Coptis japonica*. Phytochemistry, 20, 545, 1981
41. SEIBERT, M., KADKADE, P.G.: In Staba, J.E. (ed.), Plant tissue culture as a source of biochemicals, CRC Press, Boca Raton 1980, p. 123
42. WINK, M., HARTMANN, T.: In Abstr. V. Intern. Congress Plant Tissue Culture, Tokyo 1982, p. 75, cit.dle [9]
43. BÖHM, H.: In Luckner, M., Nover, L., Böhm, H. (eds.), Secondary metabolism and cell differentiation, Springer Verlag, Berlin 1977, p. 103, cit.dle [9]

44. SAMEJIMA, S. et al.: In Abstr. V. Intern. Congress Plant Tissue Cell Culture, Tokyo 1982, p. 181, cit.dle [9]
45. FURUYA, T., ISHII, T.: Japan Patent 7938 199, 1979. In: Vaněk, T., Produkce sek. metabolitů kulturami vyšších rostlin, Chem. listy 83, 287, 1989
46. CLINE, S.D., COSCIA, C.J.: In Abstract 69th Intern. Congress on Plant Tissue and cell culture, Univ. Minnesota, Aug.1986. In: Heinstein, P., Emery, A., Processes with Plant Cell Cultures, Biotechnology 6, 213, 1988, cit.dle [3]
47. FUNK, C., GUGLER, K., BRODELIUS, P.: Increased secondary produkt formation in plant cell suspension cultures after treatment with a trast carbohydrate preparation (elicitor). Phytochemistry 26, 401, 1987
48. NÁDASKÁ, M.: Využitie rastlinných bunkových kultúr pre produkciu a získavanie sekundárnych prírodných látok. Biol. listy 56, 81, 1991
49. CONSTABEL, F., EILERT, U.: Elicitacion of product accumulation. Newsletter 50, 1, 1986
50. ONDŘEJ, M.: Genové inženýrství kulturních rostlin. Academia, Praha 1992, p. 111
51. PARR, A.J., HAMILL, J.D.: Relationship between biosynthetic capacities of *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy roots and intact, uninfected plants of *Nicotiana* spp. Phytochemistry 26, 3241, 1987
52. TAEK, S.W., PARK, Y.H., CHOE, T.B.: Production of shikonin by hairy root culture of *Lithospermum erythrorhizon*. J. Microbiol. Biotechnol. 2, 41, 1992
53. SUBROTO, M.A., DORAN, P.M.: Production of steroidal alkaloids by hairy roots of *Solanum aviculare* and the effects of gibberellic acid. Plant cell tissue organ cult. 38, 93, 1994

54. DUŠKOVÁ, J. et al.: Arbutin, salicin – možnosti jejich biotechnologické produkce. Čes. slov. Farm. 54, 78, 2005
55. DUŠEK, J. et al.: Biotechnologické využití kultur vyšších rostlin in vitro. Čes. slov. Farm. 45, 209, 1996
56. ZHAO, M.Q. et al.: Studies on the arbutin biosynthesis by hairy root of Panax ginseng C.A. Mayer. China journal of Chinese materia medica 26 (12), 819, 2001
57. KREIS, W., REINHARD, E.: 12 beta-Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured Digitalis lanata cells: production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors. J. Biotechnol. 26(2-3), 257, 1992
58. ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., STÖCKIGT, J. et al.: Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. In Bartz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Plant tissue culture and its biotechnological application, Springer Verlag, Berlin 1977, p.27
59. DUŠKOVÁ, J., JAHODÁŘ, L., DUŠEK, J.: Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. a cv. Arbuta in vitro – studium vlivu prekurzorů. Čes. slov. Farm. 39, 452, 1990
60. BOUHOUCHE, N. et al.: Conversion of 3-demethylthiocolchicine into thiocolchicoside by Centella asiatica suspension cultures. Phytochemistry 47, 743, 1998
61. ASGHARI, G., LOCKWOOD, G.B.: Stereospecific Biotransformation of (+/-) Phenylethyl Propionate by cell Cultures of Perganum hamala L. Iran. Biomed. J. 6 (1), 43, 2002
62. PRAS, N.: Bioconversion of naturally occurring precursors and related synthetic compounds using plant cell cultures. J. Biotechnol. 26, 29, 1992
63. HUBÍK J. et al.: Obecná farmakognosie II. Univerzita Karlova, Praha 1978, p. 11

64. HARBORNE, J.B.: In Bell, E.A., Charlewood, B.V. (eds.), Secondary plant products, Springer Verlag, Berlin 1980, p. 329, cit dle [59]
65. JAHODÁŘ, L. et al.: Antimikrobiální působení arbutinu a extraktu z listů medvědice léčivé in vitro. Čes. slov. Farm. 34, 174, 1985
66. STRAPKOVÁ, A., JAHODÁŘ, L., NOSÁLOVÁ, G.: Antitussive effect of arbutin. Pharmazie 46, 611, 1991
67. YANG, Z. et al.: The effects of aloesin and arbutin on cultured melanocytes in a synergetic method. Chinese journal of plastic surgery 20 (5), 369, 2004
68. SUGIMOTO, K. et al.: Syntheses of alpha-arbutin-alpha-glykosides and their inhibitory effects on human tyrosinase. J. Biosci. Bioeng. 99 (3), 272, 2005
69. BOISSY, R.E., VISSCHER, M., DELONG, M.A.: Deoxyarbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. Exp. dermatol. 14 (8), 601, 2005
70. STÖCKIGT, J. et al.: Natural products and enzymes from plant cell cultures. Plant cell tissue organ cult. 43, 97, 1995
71. INOMATA, S et al.: High-level production of arbutin from hydroquinone in suspension cultures of Catharanthus roseus plant cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 315, 1991
72. LUTTERBACH, R., STÖCKIGT, J.: High-yield formation of Arbutin from hydroquinone by cell-suspension cultures of Rauwolfia serpentina. Helv. Chim. Acta 75, 2009, 1992
73. DUŠKOVÁ, J., DUŠEK, J., JAHODÁŘ, L.: Zur Biotransformation von Hydrochinon zu Arbutin in den in vitro-Kulturen. Herba Pol. 45, 23, 1999

74. DUŠKOVÁ, J., JAHODÁŘ, L., DUŠEK, J.: Zur Biotransformation von Arbutin und 4-methoxyphenol durch in vitro-Kulturen. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 33, 53, 2005
75. YOKOYAMA, M. et al.: Effects of Sugars on the Glukosylation of Exogenous Hydroquinone by *Catharanthus roseus* Cell in Suspension Culture. *Plant Cell Physiol.* 31 (4), 551, 1990
76. MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bio assays tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473, 1962
77. ČESKÝ LÉKOPIS 2005, díl 1., Grada Publishing, a.s., Praha 2005
78. VRÁNOVÁ, M.: Explantátové kultury vyšších rostlin 25. (Diplomová práce). Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2006
79. DUŠKOVÁ, J., JAHODÁŘ, L., DUŠEK, J.: Neue Möglichkeiten der Produktion von Arbutin durch Gewebekulturen. *Pharmazie* 49, 624, 1994
80. KOSTŘIBA, J.: Explantátové kultury vyšších rostlin 27. (Diplomová práce). Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2007

ABSTRACT

A biotransformation possibility of the tissue culture *Centella asiatica* (L.) was studied. These cultures were added the precursors of arbutin: hydroquinone, tyrosine, 4-hydroxybenzoic acid and p-coumaric acid into the medium. The precursors were used in a concentration of 100 mg/l and the period of their action was 6, 12, 24, 48 and 168 hours.

Positive results (both TLC and HPLC) in arbutin production were obtained in the suspension culture after an addition of hydroquinone. The largest amount of arbutin was achieved after a week's cultivation with hydroquinone (0,0429%).

ABSTRAKT

V této práci byly ověřovány biotransformační schopnosti tkáňové kultury *Centella asiatica* (L.) po přidání exogenních prekurzorů arbutinu - tyrozinu, hydrochinonu, kyseliny 4-hydroxybenzoové a p-kumarové v koncentraci 100 mg/l do živného média na dobu 6, 12, 24, 48 a 168 hodin.

Přítomnost arbutinu byla prokázána pomocí TLC a HPLC v suspenzích kulturách po aplikaci hydrochinonu. Největší množství arbutinu bylo nalezeno po týdenní kultivaci s hydrochinonem (0,0429 %).