

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA**  
**V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMAKOGNOSIE**

**ZUZANA KRŠKOVÁ**

**TRANSPORT FLAVONOIDŮ**  
**PŘES BUNĚČNÉ MEMBRÁNY II.**

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jan Martin, Ph. D.

Oponent:

Zadáno: 30. 11. 2005

Odevzdáno: 15. 5. 2007

Obhajoba: 5. 6. 2007

Děkuji Mgr. Janu Martinovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a ochotu při vypracovávání diplomové práce.

Zuzana Kršková



*Scutellaria baicalensis* Georgii (*Lamiaceae*) – Šišák bajkalský

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	6
<b>2. CÍL</b>	7
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b>	8
3. 1. Popis rostliny	8
3. 2. Droga a její využití	9
3. 3. Obsahové látky	9
3. 4. Biologické účinky	10
3. 4. 1. Vychytávání volných radikálů a antioxidační účinek	10
3. 4. 2. Antihypertenzivní a protizánětlivý účinek	11
3. 4. 3. Antibakteriální a antivirozní účinek	11
3. 4. 4. Cytostatický a imunomodulační účinek	12
3. 4. 5. Sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní působení	12
3. 4. 6. Další biologické účinky	12
3. 4. 7. Toxicita	13
3. 5. Biosyntéza flavonoidů	13
3. 6. Explantátové kultury	17
3. 6. 1. Druhy explantátových kultur	17
3. 6. 2. Kultivace explantátových kultur	18
3. 6. 3. Elicitace	19
3. 7. Buněčné transportéry	20

3. 7. 1. Struktura ABC transportérů	21
3. 7. 2. Transport sekundárních metabolitů	21
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>23</b>
<b>4. 1. Použité chemikálie a přístroje</b>	<b>23</b>
4. 1. 1. Chemikálie	23
4. 1. 2. Přístroje	23
<b>4. 2. Kultivace explantátových kultur</b>	<b>24</b>
4. 2. 1. Živné médium	24
<b>4. 3. Elicitace</b>	<b>26</b>
4. 3. 1. Sledování vlivu Mg-ATP a methylenové modři	26
4. 3. 2. Sledování vlivu Mg-ATP a peroxidu vodíku	26
<b>4. 4. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu</b>	<b>27</b>
4. 4. 1. Příprava vzorků	27
4. 4. 2. HPLC analýza	27
4. 4. 3. Validace HPLC analýzy	31
<b>4. 5. Statistické zpracování výsledků</b>	<b>31</b>
<b>5. VÝSLEDKY</b>	<b>34</b>
<b>6. DISKUZE</b>	<b>41</b>
<b>7. ZÁVĚR</b>	<b>44</b>
<b>8. LITERATURA</b>	<b>45</b>

# 1. ÚVOD

Význam léčivých rostlin neustále roste. Jsou důležitým zdrojem molekulárních struktur používaných buď přímo jako léčiva, nebo jako předlohy pro léčiva syntetická. U některých z nich je ale totální i parciální syntéza časově i finančně náročná a pro průmyslovou výrobu značně nevýhodná.

Rostlinné drogy se získávají buď sběrem přímo v přírodě, nebo umělým pěstováním na polích a v zahradách. Tyto dva zdroje však mají své nevýhody. Jsou to především nestálé přírodní podmínky, díky nimž kolísá kvantita i kvalita obsahových látek. Dále mohou být rostliny napadeny různými chorobami a škůdci a rostliny, které jsou chráněné, se nesmí vůbec sbírat.

Zmíněné problémy by mohly být vyřešeny pomocí biotechnologických metod, které využívají kultury rostlinných buněk, rostlinná pletiva a rostlinné orgány pěstované *in vitro*. Tyto tzv. explantátové kultury se dají vytvořit z jakékoliv rostliny. K jejich výhodám patří především nezávislost na podnebí, počasí a půdě, získané produkty nejsou znečištěny fungicidy, pesticidy ani insekticidy, jsou vysoce homogenní a sterilní. Rostlinné buňky explantátových kultur lze také snáze geneticky ovlivňovat.

Mnohé biotechnologické metody jsou zaměřeny na zvýšení produkce sekundárních metabolitů. Jednou z těchto metod je také elicitace, která se zabývá zvýšením nebo aktivací enzymových systémů v buňce. Tato metoda je použita také v této diplomové práci. Metoda spočívá v tom, že elicitor vyvolá v buňce stres, na který může buňka odpovídat zvýšenou tvorbou sekundárních metabolitů.

## 2. CÍL

Tato diplomová práce, která má název „Transport flavonoidů přes biologické membrány II.“, se zabývá tématem kultivace explantátových kultur šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis* Georgii, *Lamiaceae*) a možnostmi ovlivnění produkce sekundárních metabolitů (flavonoidů) v těchto kulturách.

Cílem práce bylo:

- seznámení s kultivací suspenzních kultur šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis* Georgii)
- zvládnutí HPLC analýzy pro kvantitativní stanovení sledovaných flavonoidů (baicalinu, baicaleinu)
- sledování vlivu Mg-ATP a vybraných elicitorů na transportní formu flavonoidů

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

Již od pradávna využívali lidé léčivé rostliny pro léčbu nejrůznějších onemocnění, aniž by znali obsahové látky zodpovědné za vlastní účinky rostlinných drog. Moderní věda si klade za cíl mimo jiné poznat příčiny a mechanismy terapeutických účinků těchto tradičních rostlin. Objevují se tak nejen nové obsahové látky, ale dokonce i dosud neznámé terapeutické účinky.

Předmětem zkoumání se stala také rostlina tradiční čínské medicíny - šišák bajkalský (*Scutellaria baicalensis* Georgii). V Číně (zde ji nazývají „Huang qin“) a v Japonsku (známá pod názvem „Wogon“)<sup>1)</sup> je tato léčivá rostlina používaná již přes 2000 let. Poprvé se o šišáku bajkalském zmiňuje Shennongův kánon léčivých rostlin, datovaný do období dynastie Han (206 př.n.l.-220 n.l.).<sup>2)</sup>

Hlavními obsahovými látkami šišáku jsou flavonoidy. Pro terapeutické účely se používá kořen rostliny - *scutellariae radix*.

#### 3. 1. Popis rostliny

*Scutellaria baicalensis* Georgii - šišák bajkalský - je vytrvalá rostlina z čeledi *Lamiaceae* (hluchavkovité). Je to bylina dosahující velikosti 30-60 cm, má bohatě větvenou čtyřhrannou lodyhu, která bývá na bázi purpurově červená, na vrcholu zelená, vystoupavá až poléhavá. Tuhé, kožovité listy jsou křížmostojné, jednoduché, celokrajné a kopinaté. Kořen je obvykle 2 cm tlustý, větvenovitý, na povrchu hnědý, na řezu žlutý.

Šišák kvete koncem léta a na podzim. Má nápadně modrofialové květy, které jsou uspořádány do 7-15 cm dlouhých jednostranných hroznů. Kalich květů je dvoupyský s dutým štítkovitým výrůstkem (*scutellum*), který je dobře patrný i po odkvětu na plodu. Koruna je též dvoupyská. Na bázi je prohnutá vzhůru, spodní pysk je mělce dvoulaločný, horní přilbovitý a chlupatý. Plodem je černohnědá vejcovitá tvrdka.



Šišák bajkalský roste v lesostepích východního Zabajkalí, na středním toku Amuru v Rusku, v Severní Koreji, Číně, Japonsku a severovýchodním Mongolsku. Nalezneme ho na otevřených, suchých stanovištích s přímým sluncem či polostínem. Klimatické podmínky u nás jsou pro šišák poměrně vhodné. Pěstuje se dobře.<sup>2)</sup>

### **3. 2. Droga a její využití**

Drogu tvoří kořeny tříletých nebo čtyřletých rostlin sbírané na jaře a na podzim. Kořeny se očistí, odstraní se z nich zevní hrubá vrstva a po rozkrájení na menší kousky se suší přírodním nebo umělým teplem. Šišák se v čínské medicíně používal při hypertenzi, proti krvácení z nosu, vnitřnímu krvácení, při zánětech krku a ledvin, při kašli, zvracení, silné menstruaci, ale také při záškrtu, spále a hepatitidě.<sup>3)</sup> Dnes se droga využívá jako antipyretikum, antihypertenzivum, sedativum, na léčení zánětů, alergií a při nespavosti.<sup>4, 5)</sup> Šišák však působí také na bolesti hlavy a bolesti v oblasti srdce. Vedlejší účinky drogy nejsou známy.

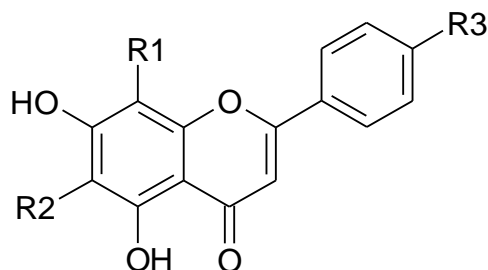
### **3. 3. Obsahové látky**

Hlavními obsahovými látkami této rostliny jsou flavonoidy. V šišáku jich bylo identifikováno přes čtyřicet. Jsou zde přítomny ve formě glykosidů jako glukuronidy, méně často jako glukopyranosidy. Liší se od sebe různým počtem a postavením hydroxylových a methoxylových skupin.

Obsah jednotlivých flavonoidů závisí na ročním období a lokalitě sběru. Nejhojnějším zástupcem flavonoidů je baicalin.<sup>6)</sup> Kořen ho obsahuje 0,1 - 20,6 % v závislosti na lokalitě sběru a klimatických podmínkách.<sup>7)</sup> Jeho aglykonem je baicalein.

Mezi další nejčastější glykosidy patří wogonosid, scutellarin a oroxylin-A-7-O-glukuronid (aglykony wogonin, scutellarein a oroxylin A).<sup>7, 8, 9)</sup>

Obr. č. 1: Základní struktura flavonoidních aglykonů rostliny *Scutellaria baicalensis* Georgii



	R 1	R 2	R 3
Baicalein	-H	-OH	-H
Wogonin	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H
scutellarein	-H	-OH	-OH
Oroxylin A	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H

Z ostatních látek byl prokázán lignanový glykosid (+)-5,5-dimethoxyariciresinol, tři sesquilignanové glykosidy hedyotol C-4''-O-β-D-glukopyranosid, hedyotol D-4''-O-β-D-glykopyranosid a erythro-guaiacylglycerol-β-syringaresinol.<sup>10)</sup> Dále droga obsahuje silice, steroly a aminokyseliny.

### 3. 4. Biologické účinky

#### 3. 4. 1. Vychytávání volných radikálů a antioxidační účinek

Volné radikály jsou látky, které jsou schopné přímo poškozovat bílkoviny, nukleové kyseliny a lipidy. Způsobují peroxidaci lipidů, což vede k narušení buněčných membrán a organel. Vzniklé peroxidy pak působí jako samotné volné radikály.

Baicalin, baicalein, wogonosid a wogonin byly zkoušeny na vychytávání volných radikálů hydroxylového, alkylového a DPPH (1,1-difenyl-2-pikrazyl) radikálu *in vitro*. Výsledky ukázaly, že aktivita vychytávání radikálů baicalinem a baicaleinem byla větší než u vitamínu E. Tato látka byla použita jako standard antioxidační aktivity.<sup>11)</sup> Wogonin a wogonosid nevykázaly téměř žádný efekt.<sup>12, 13)</sup>

Pozitivní antioxidační působení extraktu z šišáku bajkalského bylo prokázáno také v pokusech na lidských kardiomyocytech<sup>14)</sup> a neuroblastomech<sup>15, 16)</sup> a na krysích neuronech.<sup>17, 18)</sup> Také se potvrdilo pozitivní působení proti oxidaci způsobené UV zářením.<sup>19)</sup> Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval acetonový extrakt.<sup>20)</sup>

#### 3. 4. 2. Antihypertenzivní a protizánětlivý účinek

Antihypertenzivní a protizánětlivé účinky šišáku bajkalského jsou způsobeny inhibicí enzymu lipoxygenasy. Tento enzym se účastní na zánětlivých procesech. Baicalein způsobí blokaci oxidace kyseliny arachidonové a tím zabraňuje syntéze leukotrienů (mediátorů zánětu) a nepřímo tak podporuje syntézu prostaglandinu PGI<sub>2</sub>.<sup>21, 22, 23)</sup> Inhibicí lipoxygenasy se také blokuje zvýšená inkorporace leucinu v srdečních fibroblastech a tím lze předejít hypertrofii srdeční svaloviny.<sup>24)</sup> Stejným způsobem se může snižovat množství aktivovaného endotelinu, který je významným vasokonstriktorem.<sup>25)</sup> Wogonin také ovlivňuje produkci oxidu dusnatého (vasodilatátoru) v organismu.<sup>26)</sup>

#### 3. 4. 3. Antibakteriální a antivirozní účinek

Nejúčinnější látkou se ukázal být baicalin, který je aktivní hlavně proti chřipkovým virům a baktérii *Staphylococcus aureus*.<sup>27, 28, 29)</sup> Dále se prokázal také jeho účinek proti HIV viru. Wogonin je účinný proti viru hepatitidy B a RSV viru (respiratory syncytial virus). Extrakt z drogy působí také proti *Candida albicans*,

*Cryptococcus neoformans*, trypanozomám a proti bakteriím způsobujícím zubní kazy.<sup>30)</sup>

#### 3. 4. 4. Cytostatický a imunomodulační účinek

Antioxidační a antivirozní účinek působí také preventivně proti vzniku nádorů a potlačuje již vzniklé rakovinné projevy.<sup>31)</sup> Baicalin též působí proti některým genotoxinům<sup>32)</sup> a zabraňuje proliferaci již vzniklých nádorů (nádory prostaty<sup>34)</sup>, kůže<sup>35)</sup> a prsu<sup>36)</sup>).

U wogoninu byla zjištěna schopnost zasahovat do metabolismu aflatoxinu B<sub>1</sub>, a to na úrovni jeho přeměny na aflatoxin M<sub>1</sub> cytochromem P 450.<sup>33)</sup>

Extrakt z šiřáku také normalizuje počet T-lymfocytů, zvyšuje tvorbu imunoglobulinu A a stimuluje krevetvorbu.<sup>37, 38)</sup>

#### 3. 4. 5. Sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní působení

Flavonoidy mají podobnou strukturu jako benzodiazepiny, proto se snadno váží na GABA<sub>A</sub> receptory a způsobují tak hyperpolarizaci nervové buňky. Výsledkem je mírně sedativní účinek.<sup>39)</sup> U wogoninu byl prokázán také výrazný anxiolytický účinek.<sup>40)</sup> Naopak flavonoid oroxylin A působí jako antagonist - ruší poruchy motorické koordinace a anxiolytický a myorelaxační účinek.<sup>41)</sup> Vodný extrakt z *radix scutellariae* má také antikonvulzivní působení.<sup>42)</sup>

#### 3. 4. 6. Další biologické účinky

Flavonoidy z šiřáku bajkalského působí i na fibrinolytický systém, kde inhibují trypsinem zvýšenou produkci PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) a zastavují redukci t-PA (tissue-type plasminogen activator). Baicalin též snižuje hladinu intracelulárního vápníku.<sup>43)</sup>

Dále byl pozorován vasokonstrikční a vasodilatační účinek. Baicalin v malé koncentraci způsobuje vasokonstrikci, pravděpodobně inhibicí produkce NO. Ve vyšších koncentracích (30-300  $\mu\text{M}$ ) arteriální svalovina relaxuje - flavonoidy ovlivňují proteinkinasu C.<sup>44)</sup>

Na antialergickém účinku se podílí efekt protizánětlivý, zprostředkovaný inhibicí lipoxygenasy, a také efekt imunomodulační. Dále dochází k inhibici produkce chemokinu eotaxinu, který je zodpovědný za zapojení eosinofilů do alergické reakce.<sup>45)</sup>

Baicalin také inhibuje enzym xanthinoxidasu, čímž se stává potenciálním lékem na dnu.<sup>46)</sup> Spolu s baicalinem inhibují enzym fosfolipasu C, který ovlivňuje například množení buněk, syntézu glykogenu a svým rozkladem poskytuje prekurzor pro tvorbu prostaglandinů.<sup>47)</sup>

#### 3. 4. 7. Toxicita

Vedlejší účinky drogy nebyly zatím poznány. Wogonin má sice mírný mutagenní efekt, ale v rostlině ho není takové množství, aby se to projevilo. Vzhledem k této skutečnosti však není vhodné dlouhodobé užívání drogy.<sup>48)</sup> Droga se nedoporučuje v těhotenství a laktaci, při epilepsii a jiných poruchách CNS. Připouští se též interakce s látkami ovlivňující CNS a kardiovaskulární systém.<sup>49)</sup>

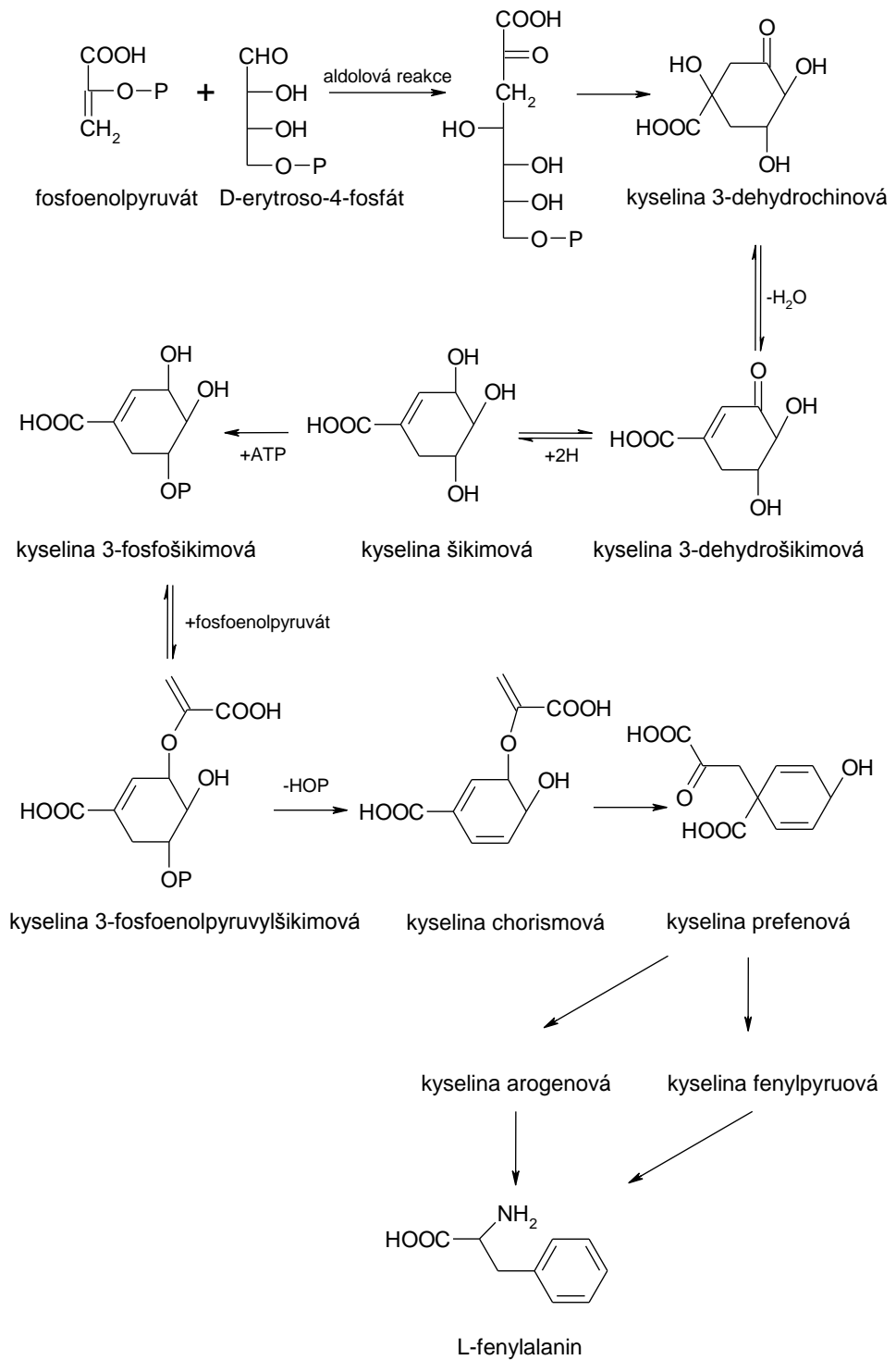
### **3. 5. Biosyntéza flavonoidů**

Biosyntéza vychází z metabolismu kyseliny šikimové. Tato biosyntetická cesta je vyvinuta jen u mikroorganismů a rostlin, které slouží k produkci aromatických aminokyselin.

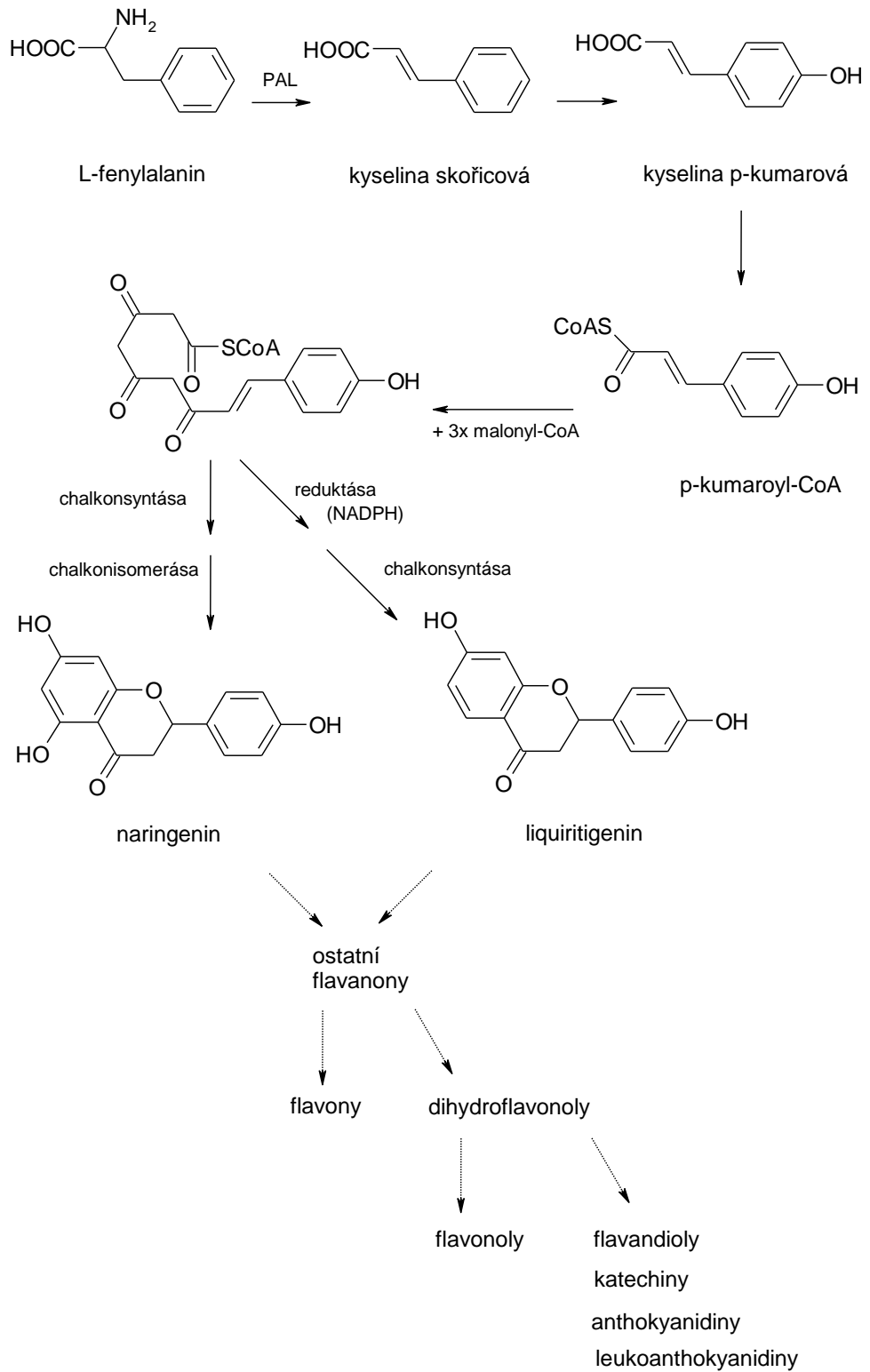
Z nich je pro syntézu flavonoidů klíčový L-fenylalanin, který se po eliminaci aminoskupiny pomocí PAL (phenylalanine ammonia lyase) mění na kyselinu skořicovou.

Po přeměně na p-kumarovou kyselinu a přijetí koenzymu A je molekula schopná reagovat se třemi molekulami malonyl-CoA, pocházejícími z acetátové biosyntetické cesty. Tím vzniká molekula s polyketidickým řetězcem, která se pomocí chalkonsyntasy zacyklí a vytváří naringenin. Popřípadě předchází ještě redukce a vzniká liquiritigenin. Naringenin a liquiritigenin jsou dvě základní flavonoidní struktury.<sup>50)</sup>

Obr. č. 2: Šikimátová biosyntetická cesta



Obr. č. 3: Biosyntéza flavonoidů





### 3.6. Explantátové kultury

Biotechnologické metody umožňují kultivovat rostlinné buňky, pletiva, orgány nebo také celé rostliny v podmínkách *in vitro*.

Díky těmto kultivacím se mohou snadněji ovlivňovat biochemické procesy uvnitř buněk, a tím například zvýšit rychlost růstu, odolnost proti nepříznivým vlivům a nebo zvýšit kumulace látek primárního a sekundárního metabolismu.

Explantátové kultury jsou nezávislé na geografických a klimatických faktorech a jejich kultivace probíhá v kontrolovatelných a reprodukovatelných podmínkách, což patří bezesporu k jejich velkým výhodám. Takto získaný produkt si zachovává stále stejnou kvalitu a jeho produkce se může rychle přizpůsobit poptávce.

Z farmaceutického hlediska je významné především ovlivňování produkce sekundárních metabolitů, protože většina těchto látek je unikátních a živočichové ani mikroorganismy takové látky netvoří. Díky metodám genetické manipulace jsou explantátové kultury schopné tvořit dokonce látky naprosto cizorodé.

Explantátové kultury se tak využívají při množení a šlechtění rostlin a při testování biologické aktivity některých látek (herbicidů, pesticidů, mutagenů, rostlinných regulátorů apod.). Kultury slouží také k výzkumu biochemických pochodů v rostlinných buňkách.<sup>51)</sup>

#### 3. 6. 1. Druhy explantátových kultur

Rostlinné buňky mají vlastnost, která se nazývá totipotence. To znamená, že každá buňka obsahuje genetickou informaci pro celou rostlinu a může se pomocí postupné diferenciací regenerovat v celou fertilní rostlinu. Je tedy možné vytvořit různé explantátové kultury.<sup>52)</sup> Jsou to kultury nediferencované kalusové, suspenzní kultury, prýtové a kořenové kultury, embryonální kultury a klony původní intaktní rostliny. Explantátové kultury se dále dělí na kultury protoplastů, kultury buněčné,

kultury suspenzní, kultury orgánové, kultury tkáňové, prašnikové kultury a kultury mikrospor.<sup>53)</sup>

### 3. 6. 2. Kultivace explantátových kultur

Kultivace explantátových kultur probíhá ve sterilních podmínkách na živné půdě.

Živná půda obsahuje látky nezbytné pro život rostlinných buněk. Mezi základní druhy patří medium podle Murashigeho a Skooga - tzv. MS<sup>54)</sup>, médium podle Gamborga (B5)<sup>55)</sup> a médium podle Schenka a Hildebrandta (SH).<sup>56)</sup>

Základní složky živného média tvoří:

- voda
- zdroj uhlíku - nejčastěji cukr (glukosa, laktosa, škrob), CO<sub>2</sub> nebo organická kyselina
- zdroj dusíku - nitráty, amonné soli, aminokyseliny
- ostatní makroelementy – fosfor, vápník, hořčík, draslík a síra ve formě solí
- mikroelementy – železo, mangan, měď, zinek, bor, molybden, kobalt a další
- vitamíny – pyridoxin, thiamin, kyselina nikotinová, biotin, myoinositol, vitamin C
- nedefinované směsi přírodních látek (organické extrakty jako hydrolyzát kaseinu, pepton, kokosové mléko, kvasnicový extrakt)
- regulátory růstu – fytohormony – auxiny, cytokiny, gibbereliny

Pro kultivaci kultur je také nutné zajistit vhodné fyzikální podmínky:

- teplota – nejčastěji v rozmezí 17- 25 °C
- intenzita osvětlení – od 2000 do 5000 luxů
- hodnota pH – nejčastěji v rozmezí 5,5 - 6,0
- množství O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> a jiných plynů<sup>51)</sup>

### 3. 6. 3. Elicitace

Elicitace je metoda, která využívá schopnosti rostlin a jejich buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové faktory. Elicitor je látka nebo děj, která stres vyvolává a spouští tak obrannou reakci rostlinné buňky. Elicitory se rozdělují na abiotické a biotické. Mezi elicitory abiotické patří fyzikální faktory (např. změny teplot, osmotického tlaku, pH a UV záření) a dále také různé chemické látky (toxické kovy, pesticidy, herbicidy a antibiotika). Biotickými elicitory jsou viry, bakterie, houby, kvasinky, jejich fragmenty anebo látky z nich získané.<sup>58, 59)</sup>

Primární reakcí rostlinné buňky na biotický elicitor je jeho rozpoznání po navázání na buněčný receptor. Po aktivaci receptoru dojde k přenosu signálu pomocí přenašečů do intracelulárního prostoru buňky. Přenos je možný pomocí několika systémů:

- systém c AMP, který spočívá v navázání guanosintrifosfátu na G-protein. Ten aktivuje ATP-asu a vzniká c AMP, který mění aktivity proteinkinas a fosfatas. Následná fosforylace/defosforylace řady intracelulárních enzymů vede ke změně metabolismu buňky.

- systém fosfoinositidový začíná hydrolýzou membránových lipidů fosfolipázou C na dvě signální molekuly: inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). Zatímco DAG přímo přes proteinkinasy ovlivňuje fosforylaci proteinů, IP3 působí přes další nosiče signálu ( $Ca^{2+}$ , kalmodulin) a kromě fosforylace proteinů ovlivňuje i expresi genů.

- systém reaktivních forem kyslíku spočívá nejen v přímém působení kyslíkových radikálů na expresi genů, ale i v působení přes peroxidaci membránových lipidů a tvorbu kyseliny jasmonové a metyljasmonát, které následně ovlivňují transkripci.

- systém tvorby etylenu a další systémy - zatím nedostatečně prozkoumané (např. změny elektrochemického potenciálu způsobené změnou přestupu některých iontů).<sup>58, 59, 60)</sup>

Vlastní obrana buňky po přenosu signálu spočívá ve změně buněčného metabolismu. Působením elicitoru dojde ke krátkodobému a přechodnému zvýšení hladiny některých enzymů a začnou se produkovat a akumulovat obranné látky, které vzniklý stres eliminují. Může se to projevit v syntéze specifických stresových proteinů, což mohou být například hydrolasy napadající buněčnou stěnu patogenů. Dále se tvoří osmoregulační látky, látky, které se podílejí na tvorbě a odstraňování aktivních forem kyslíku, peroxidasy a antioxidační sloučeniny.

Kromě stresových proteinových látek může být iniciována syntéza nízkomolekulárních látek sekundárního metabolismu, které mají další ochranné funkce (fytoncidy, fytoalexiny, fytoanticipiny). Tyto obranné látky bývají druhově specifické a patří mezi ně terpeny, flavonoidy, stilbeny, steroidy, antraceny a další.<sup>58, 59, 61)</sup>

### **3. 7. Buněčné transportéry**

Skupina „ATP binding cassette“ (ABC) transportérů je rozsáhlá, všudypřítomná a různorodá skupina proteinů, jejíž členové zprostředkovávají široký okruh transportních funkcí.<sup>62)</sup> ABC přenašeče se podílejí na aktivním transportu celé řady látek přes buněčné membrány. Pro naprostou většinu z nich slouží jako zdroj energie molekula ATP.

Do dnešní doby bylo identifikováno přes sto ABC proteinů, v taxonomickém rozmezí od bakteriálních až po lidské. Pomocí těchto proteinů jsou transportovány různé substráty - například peptidy, sacharidy, lipidy, cheláty těžkých kovů, polysacharidy, alkaloidy, steroidy, anorganické kyseliny a konjugáty glutathionu.<sup>62, 63)</sup>

ABC transportéry se rozdělují do 3 podskupin: MDR (multidrug resistance) proteiny - sem patří např. P-glykoprotein, zodpovědný za rezistenci buněk vůči cizorodým látkám<sup>64)</sup>, MRP (multidrug resistance associated ) proteiny - např. GS-X

(glutathione-S-conjugate pump)<sup>65)</sup> a nejmladší PDR5, zatím málo prozkoumaná, která byla objevena u vodních rostlin.<sup>66, 67)</sup>

### 3. 7. 1. Struktura ABC transportérů

Obvykle se ABC transportéry skládají ze dvou kopií, každá ze dvou strukturních jednotek: z vysoce hydrofobní transmembránové domény (TMD) a z periferně lokalizované ATP vázající domény nebo nukleotidy vázající složky (NBF). Obě tyto komponenty jsou pro transport často nezbytné. Pomocí TMD přecházejí substráty přes membránu a tyto složky také přispívají k substrátové specifitě. NBF domény jsou lokalizované na cytoplazmatické straně membrány a hydrolyzují dvě molekuly ATP. Nachází se zde uzavřené oblasti asi 200 aminokyselin, skládající se z pohyblivého A a B boxu. Je to specifická sekvence, která odlišuje ABC transportéry od ostatních NTP (nukleotid trifosfát) vázající proteinů jako jsou kinasy, které také obsahují pohyblivé sekvence.<sup>68, 69)</sup>

Sekundární struktura byla zkoumána u MDR P-glykoproteinu a MRP proteinu. P-glykoprotein tvoří šest helixů procházející přes membránu a ke každému patří ATP vázající doména.<sup>70, 71, 72)</sup> Členové MRP podskupiny mají rozsáhlé hydrofobní N-prodloužení (umístěné extracelulárně) na jádru, které se skládá ze dvou transmembránových a dvou ATP vázajících domén.<sup>73, 74)</sup>

### 3. 7. 2. Transport sekundárních metabolitů

V mnoha případech vakuolárního vychytávání sekundárních metabolitů bylo dokázáno, že je specifické pro dané komponenty a rostlinné druhy. Většina rostlin obsahuje glykosylované sekundární metabolity. Vakuolární transport glykosylovaných derivátů je obvykle zprostředkován pomocí antiportu proton-substrát.

Je však známo několik případů, kde mohou sekundární metabolity nést také záporný náboj (např. glukuronidy). Flavonové glukuronidy (v šišáku bajkalském je to baicalin) jsou vychytávány pomocí přímé energetické utilizace Mg-ATP. To dokazuje přítomnost ABC transportérů, které patří do podskupiny MRP proteinů, a které transportují negativně nabitě organické molekuly. Výsledky pokusů poukazují na to, že vakuolární MRP pumpa pro rostlinné flavonové glukuronidy je přítomná v různých rostlinných druzích.<sup>75)</sup>

Vzhledem k transportním charakteristikám a pozorovaným inhibičním profilům se předpokládá, že v rostlinách existují vysokokapacitní vakuolární ABC transportéry pro flavonové glukuronidy, i jiné negativně nabitě organické sloučeniny, a to dokonce bez ohledu na to, jestli je rostlina schopná glukuronidové komponenty produkovat.<sup>75)</sup>

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4. 1. Použité chemikálie a přístroje

#### 4. 1. 1. Chemikálie

- metanol pro HPLC: Fluka, Buchs
- baicalin č., baicalein č., Mg-ATP č.: Sigma –Aldrich Chemie, Steinheim
- kyselina  $\alpha$ -naftyloctová č., myoinositol puriss.: Sigma, St.Luis
- chlorid thiaminia puriss., chlorid pyridixinia puriss.: Koch-Light Laboriem Ltd., Colnbrook Hampshire
- enzymatický hydrolyzát kaseinu: Imuna, Šarišské Michalany
- peroxid vodíku: Penta, Chrudim
- dihydrofosforečnan draselný č., dusičnan draselný p.a., dusičnan amonný p.a., glycin č., hydrogenfosforečnan sodný p.a., chlorid kobaltnatý p.a., chlorid vápěný p.a., jodid draselný p.a., kyselina boritá p.a., kyselina o-fosforečná č., kyselina nikotinová č., metanol p.a., metylenová modř pro mikro, molybdenan sodný p.a., petroleter p.a., sacharoza p.a., síran hořečnatý p.a., síran manganatý p.a., síran měďnatý p.a., síran zinečnatý p.a., síran železnatý p.a.: Lachema, Brno

#### 4. 1. 2. Přístroje

- autokláv PS 20A, horkovzdušný sterilizátor  
HS 81A, Chirana, Brno
- analytické váhy A 200S: Sartorius, Göttingen
- box s laminárním prouděním Fatran L-F: Výrobné družstvo  
Pokrok, Žilina
- vodní lázeň KL: Laboratorní přístroje, Praha

- HPLC chromatograf JASCO (čerpadlo PU-2089, diodový detektor MD-2015, autosampler AS-2055): Jasco International, Tokyo
- třepačka CEROMAT MO: B. Braun Bitech. International, Melsungen
- termostat kolony JETSTREAM 2 PLUS: Alltech Associates Inc., Deerfield
- chromatografická kolona LiChrospher RP-18, 250 × 4 μm: Merck, Darmstadt

#### **4. 2. Kultivace explantátových kultur**

Suspenzní kultury, které byly použity k vypracování diplomové práce, byly odvozeny z kalusových kultur mechanickým rozvolněním kalusů. Kultivace probíhala v 250 ml baňkách s plochým dnem na rotační třepačce (120 ot./min). Objem média v baňkách byl 50 ml a kultivační perioda 12-14 dní. Pasážování suspenzních kultur bylo prováděno pomocí sterilních pipet (sterilizace v autoklávu po vsunutí chomáčku vaty, obalení v hliníkové folii, 15 minut při 120 °C). K experimentální práci byla použita 49. a 50. pasáž.

##### 4. 2. 1. Živné médium

Kalusové kultury šišáku bajkalského byly kultivovány na půdě podle Murashigeho a Skooga, jejíž složení je následující:



CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	440,000 mg/l
KNO <sub>3</sub>	1 900,000 mg/l
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370,000 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	170,000 mg/l
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,840 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	37,370 mg/l
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	22,300 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	11,500 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200 mg/l
KI	0,830 mg/l
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
Inositol	100,000 mg/l
Hydrolyzát kaseinu	1 000,000 mg/l
Glycin	2,000 mg/l
Kyselina nikotinová	0,500 mg/l
Thiamin hydrochlorid	0,100 mg/l
Pyridoxin hydrochlorid	0,500 mg/l
Sacharosa	30 000,000 mg/l

Tato množství byla odvážena na analytických vahách, látky potřebné v menším množství byly odpipetovány ze zásobních roztoků.

Jako růstový stimulátor byla použita kyselina  $\alpha$ -naftyloctová ve formě lihového roztoku a v koncentraci 10 mg na 1 litr média.

### 4. 3. Elicitace

#### 4. 3. 1. Sledování vlivu Mg-ATP a methylenové modři

Byla sledována produkce sekundárních metabolitů v suspenzních kulturách po elicitaci radikálem kyslíku, vytvářeného přímo v médiu pomocí methylenové modři.

K suspenzním kulturám byla přidána na konci jejich kultivační periody methylenová modř. Tento elicitor byl přidáván vždy po 1 ml ze sterilních zásobních roztoků, tak aby výsledná koncentrace v baňkách byla 100 mg/l. K dalším kulturám byla stejným způsobem přidána methylenová modř a navíc 1 ml roztoku Mg-ATP (výsledná koncentrace v baňkách byla 3 mmol/l, převzato z práce Walczaka et al.<sup>79</sup>). Ke kontrolním kulturám se přidával 1 ml sterilní vody. Následná kultivace probíhala při 16 h světelné periodě a 25°C. Vzorky kultur byly odebírány po 180, 300 a 1440 minutách. Po usušení a extrakci byl stanoven pomocí metody HPLC obsah baicaleinu a baicalinu.

#### 4. 3. 2. Sledování vlivu Mg-ATP a peroxidu vodíku

Touto abiotickou elicitací byl učiněn pokus pozitivně ovlivnit produkci baicalinu a baicaleinu v suspenzních kulturách šišáku bajkalského. K suspenzním kulturám byl na konci jejich kultivace přidáván jako elicitor peroxid vodíku. Peroxid vodíku byl přidáván vždy po 1 ml ze sterilních zásobních roztoků, tak aby výsledná koncentrace v baňkách byla 13,6 mg/l (odpovídající 4 $\mu$ mol/g, převzato z práce Morimota et al.<sup>57</sup>). K dalším kulturám se přidával kromě H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 1ml zásobního roztoku Mg-ATP (výsledná koncentrace v baňkách byla 3 mmol/l). Ke kontrolním kulturám se přidával 1 ml sterilní vody. Další kultivace probíhala při 16 hodinové světelné periodě při 25 °C. Vzorky byly odebírány po 30, 60, 180 a 300 minutách a obsah baicaleinu a baicalinu se stanovil pomocí HPLC.

#### **4. 4. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu**

##### 4. 4. 1. Příprava vzorků

Nejprve se suspenzní kultury přefiltrovaly a promyly vodou. Poté se nechaly volně proschnout na filtračním papíře po dobu 24 hodin a následně se dosušily v sušárně při 50 °C. Sušený materiál se rozdrobil v třence a provedla se extrakce: vzorek o hmotnosti 0,2000 g rostlinného materiálu byl dvakrát extrahován 10 ml 80 % metanolu na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Objem se po extrakci doplnil na 20 ml pomocí 80% metanolu. Chlorofyl a lipidy byly odstraněny několikanásobným třepáním s petroléterem. Poté se vzorky zfiltrovaly teflonovým mikrofiltrem (0,45 µm) a tak byly připraveny k HPLC analýze.

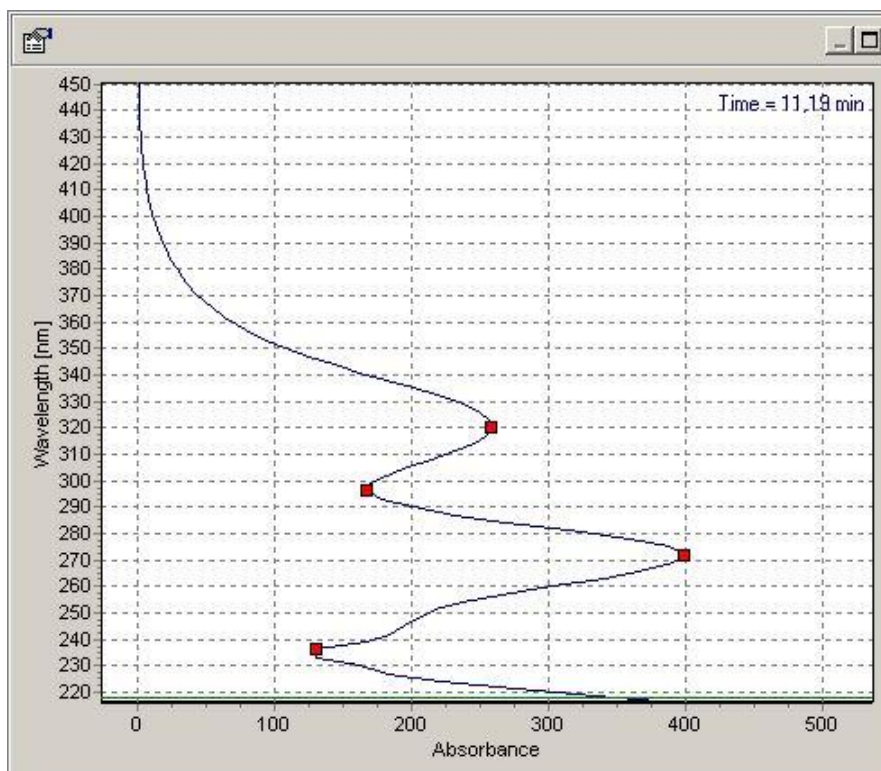
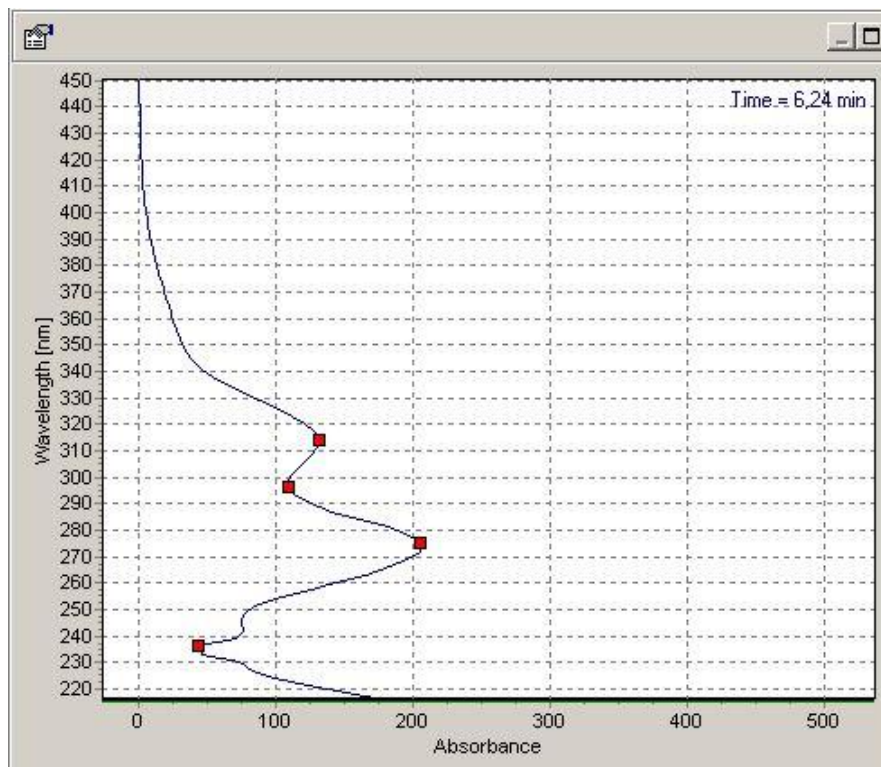
##### 4. 4. 2. HPLC analýza

HPLC analýza byla prováděna na sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055). Sestava byla vybavena předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18, 250×4 µm s ochrannou předkolumnou.

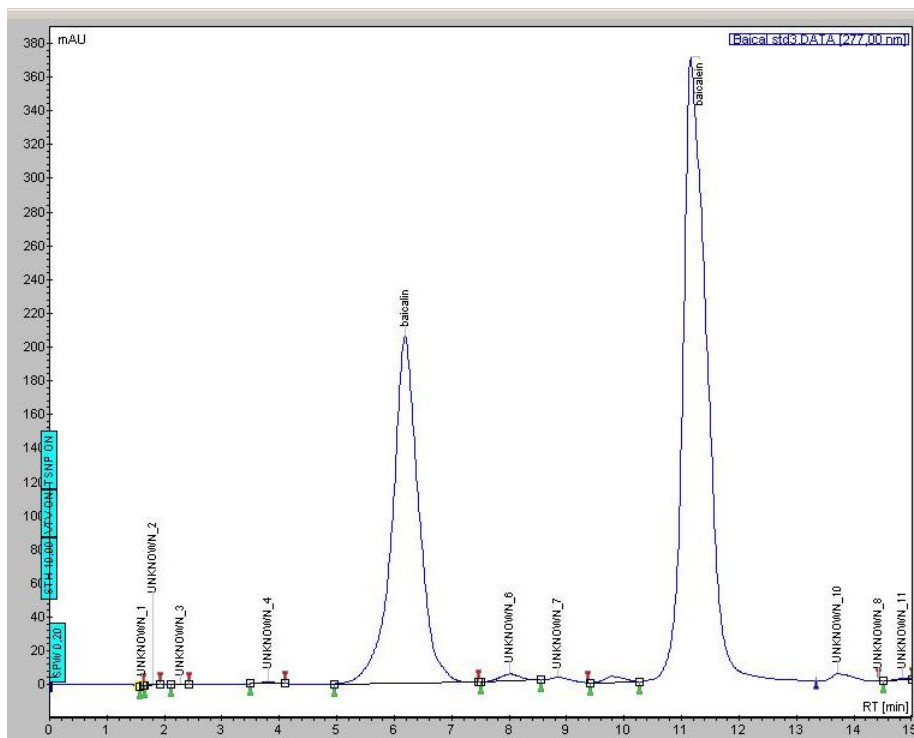
Nastříkovaný objem byl 20 µl. Složení mobilní fáze probíhalo v lineárním gradientu z 50 % metanolu s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné (pH=2,9) v čase  $t = 0$  na 75 % metanol s 0,15 % kyselinou fosforečnou v čase  $t = 15$  min při konstantním průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min.

Detekce byla prováděna pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190 – 450 nm. Obsah sledovaných flavonoidů byl vypočten z píků při vlnové délce 277 nm, ve které mají oba flavonoidy své absorpční maximum. Retenční časy u baicalinu byl cca 6 minut 33 sekund, u baicaleinu cca 11 minut 40 sekund. Obsah obou látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí vnějšího standardu téže látky.

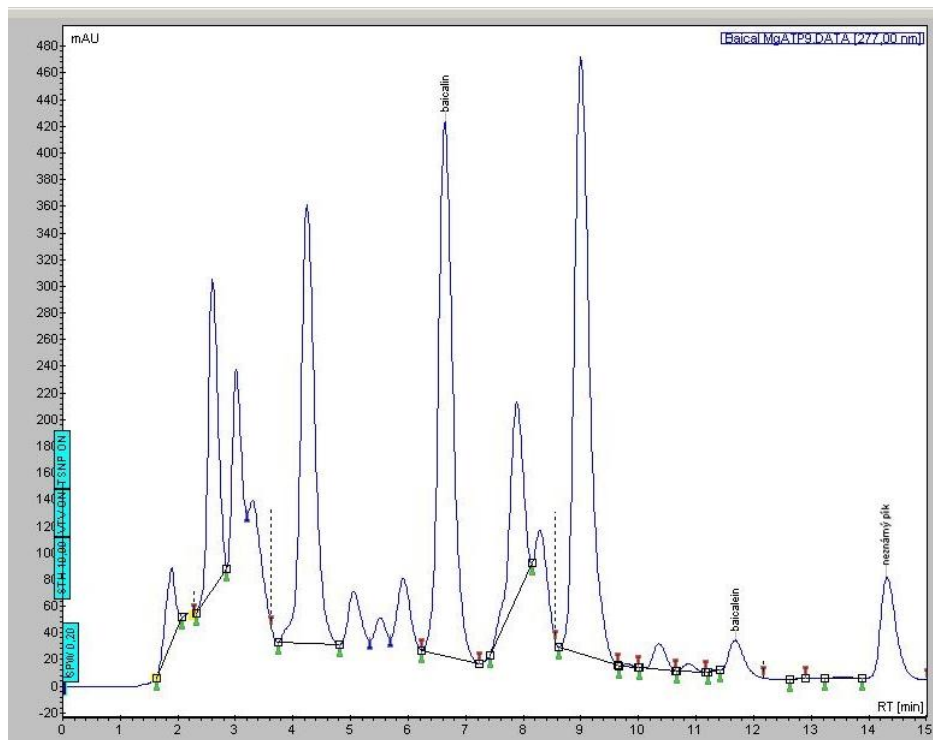
Obr. č. 4: Absorpční spektrum baicalinu (nahore) a baicaleinu (dole).



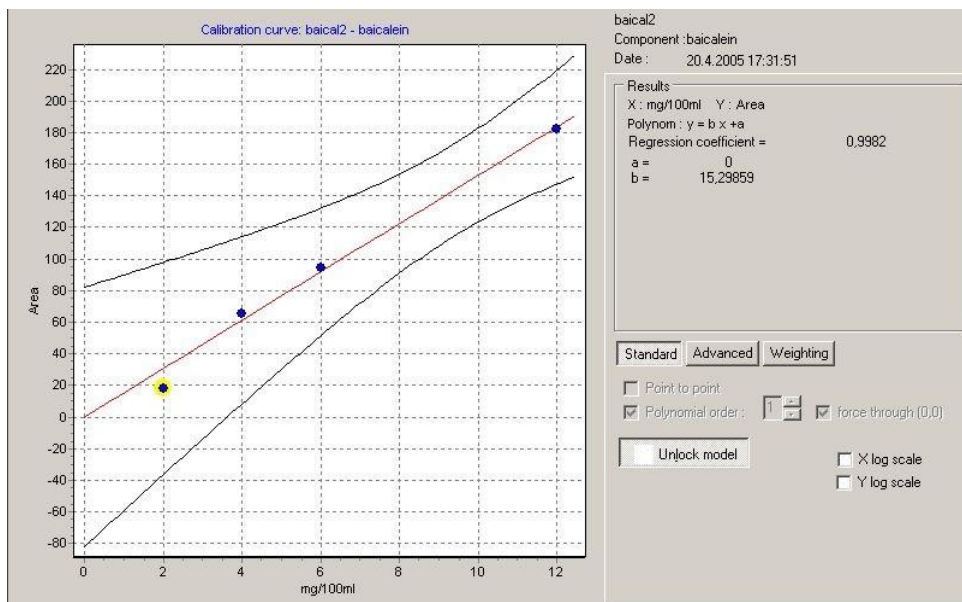
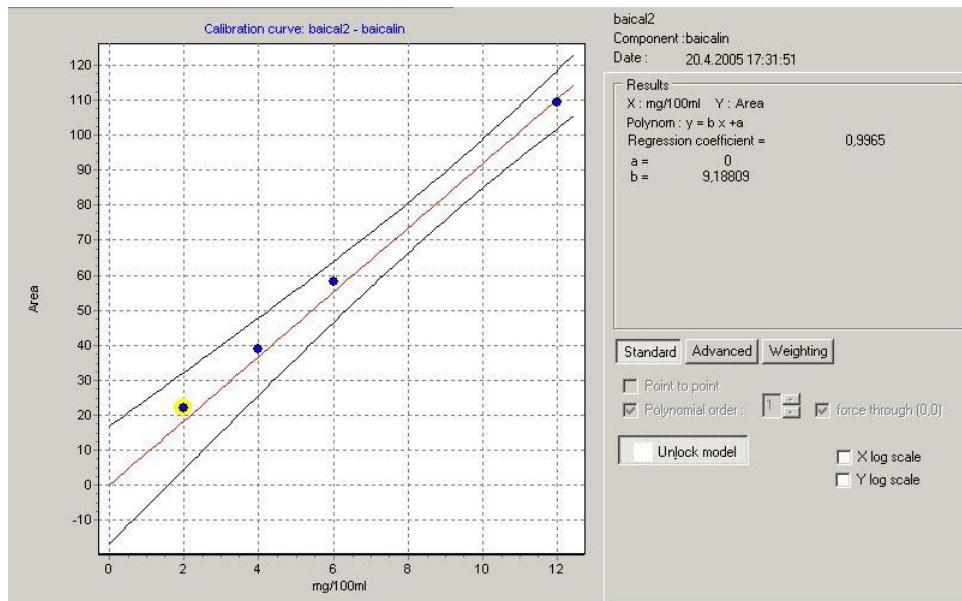
Obr. č. 5: Ukázka chromatogramu standardů baicalinu a baicaleinu.



Obr. č. 6: Ukázka chromatogramu vzorku připraveného z *in vitro* kultury.



Obr. č. 7: Kalibrační křivka baicalinu (nahore) a baicaleinu (dole)



#### 4. 4. 3. Validace HPLC analýzy

Validace je ověření platnosti zvoleného analytického postupu.

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco) a to normou ISO 9001 (International Organisation for Standardiation). Způsobilost chromatografického systému byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku - tzv. test na přesnost (provedeno vždy 6 nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearity (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu  $r$ , která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 3.vydání: Asymetrie píku a Počet teoretických pater. Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry:

Správnost metody - jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou nebo srovnáním s referenčním materiálem).

Kvantitativní limit - jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností (relativní směrodatná odchylka menší než 15%).

#### **4. 5. Statistické zpracování výsledků**

Statistická významnost naměřených výsledků byla vypočítána pomocí t-testu významnosti dvou průměrů (pro rovnost rozptylů) podle následujících matematických vztahů:

Aritmetický průměr:

$$X = \frac{\sum_{i=1}^a x_i}{a}$$

kde  $x_i$  = naměřené hodnoty,  $a$  = rozsah souboru

Směrodatná odchylka:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^a (x - x_i)^2}{a - 1}}$$

kde  $x$  = aritmetický průměr,  $x_i$  = naměřené hodnoty,  $a$  = rozsah souboru

Testovací kritérium:

$$T = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{a_1 \cdot s_1^2 + a_2 \cdot s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{a_1 \cdot a_2 (a_1 + a_2 - 2)}{a_1 + a_2}}$$

kde  $x_1$  = aritmetický průměr kontrolního souboru,  $x_2$  = aritmetický průměr pokusného souboru,  $s_1$  = směrodatná odchylka kontrolního souboru,  $s_2$  = směrodatná odchylka pokusného souboru,  $a_1$  = počet členů kontrolního souboru,  $a_2$  = počet členů pokusného souboru

Testovací kritérium přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočteným podle vzorce:

$$V = a_1 + a_2 - 2$$



Pokusný soubor se od kontrolního souboru statisticky významě liší v případě, že vypočtené testovací kritérium  $t$  je větší než kritická hodnota  $t_p$  pro vypočtený stupeň volnosti  $v$  na hladině významnosti  $p$  ( $p = 0,05$ ).<sup>51)</sup>

## 5. VÝSLEDKY

Výsledky chemické analýzy obsahu flavonoidů baicalinu a baicaleinu v explantátových kulturách jsou uvedeny ve formě tabulek a grafů.

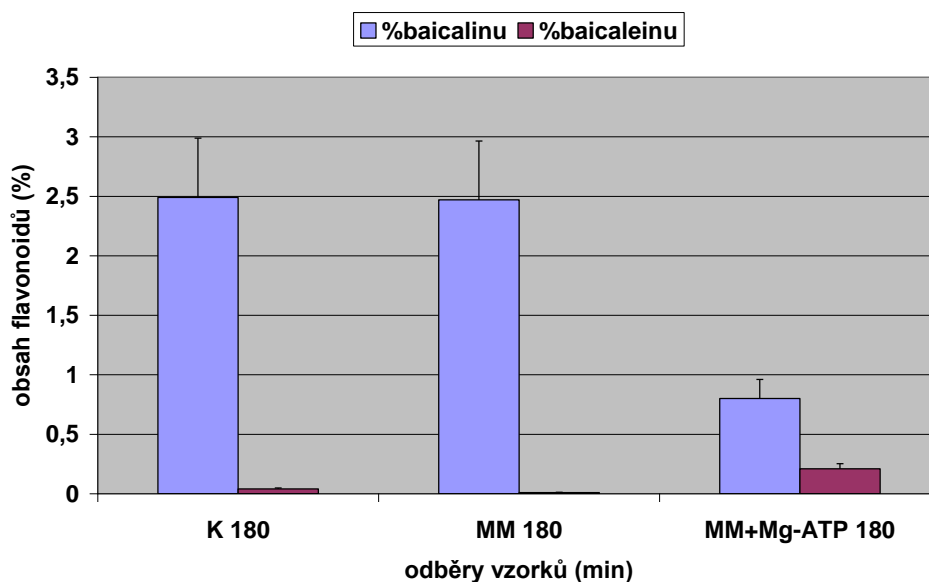
Veškeré výsledky hodnot jsou průměrem ze tří samostatných výsledků stanovení.

**Tabulka č. 1: Vliv methylenové modři (100 mg/l) a Mg-ATP (1,522 g/l) na suspenzní kulturu šišáku bajkalského**

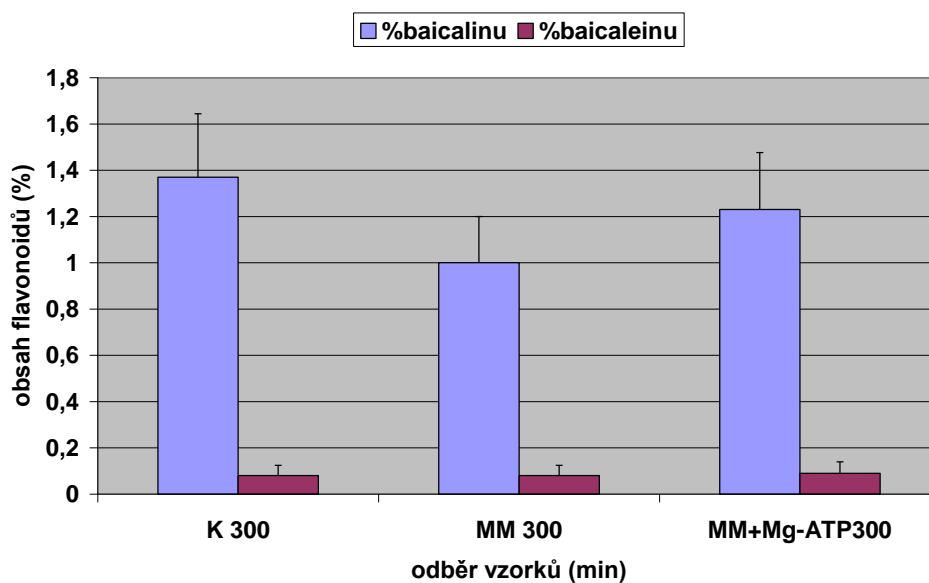
<b>Vzorek a doba odběru (min)</b>	<b>Baicalin (%)</b>	<b>Baicalein (%)</b>	<b>Teoretické množství 6,7- dehydrobai- caleinu (%)</b>
<b>K 180</b>	2,49	0,04	0,05
<b>MM 180</b>	2,47	0,01	0,05
<b>MM + Mg-ATP 180</b>	0,80	0,21	0,70
<b>K 300</b>	1,37	0,08	0,33
<b>MM 300</b>	1,00	0,08	0,39
<b>MM + Mg-ATP 300</b>	1,23	0,09	0,29
<b>K 1440</b>	1,31	0,00	0,03
<b>MM 1440</b>	1,84	0,00	0,03
<b>MM + Mg-ATP 1440</b>	1,11	0,10	0,07

K = kontrola, MM = methylenová modř, Mg-ATP = hořečnatá sůl adenosintrifosfátu

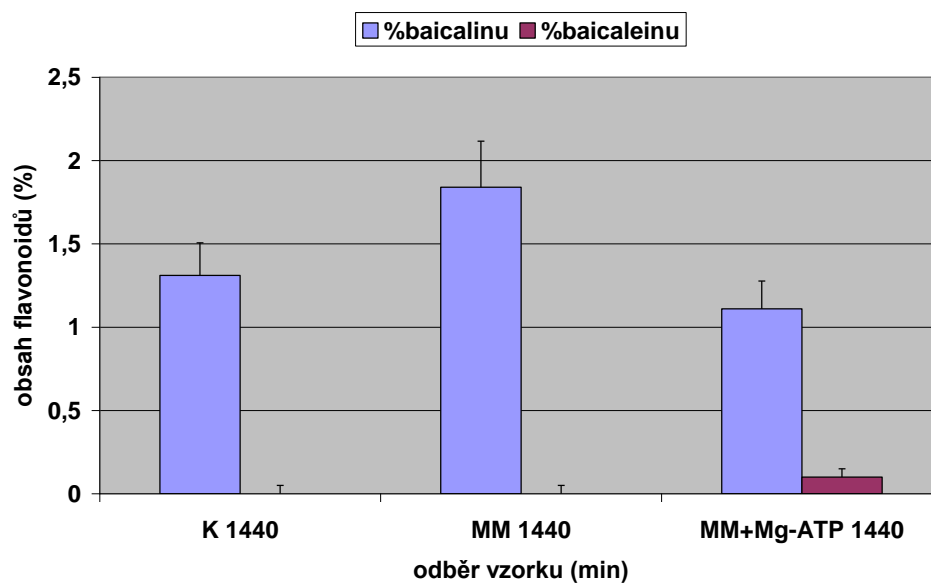
**Graf č.1: Vliv methylenové modři a Mg-ATP na suspenzní kulturu šišáku bajkalského v čase 180 min**



**Graf č.2.: Vliv methylenové modři a Mg-ATP na suspenzní kulturu šišáku bajkalského v čase 300 min**



**Graf č.3.: Vliv methylenové modři a Mg-ATP na suspenzní kulturu šišáku bajkalského v čase 1440 min**

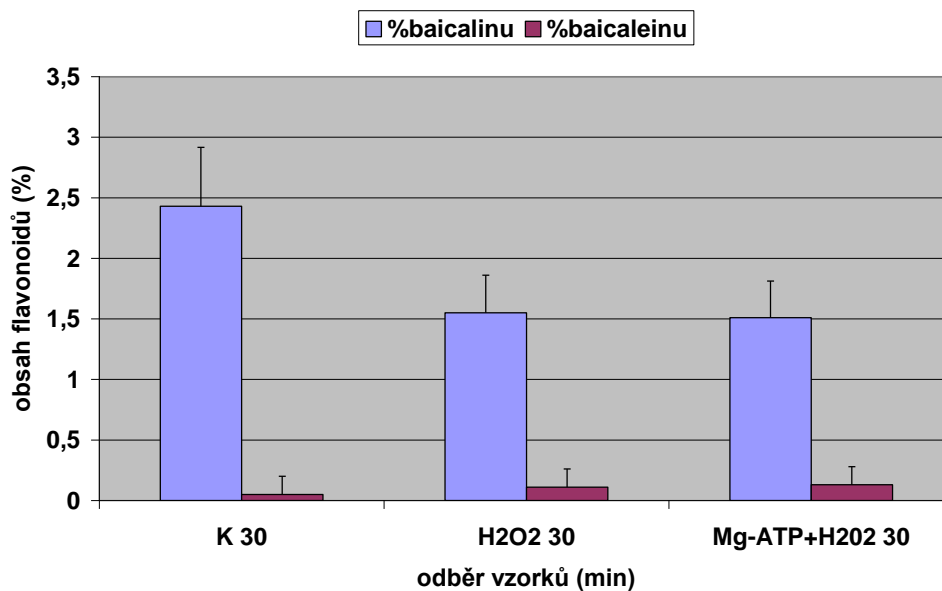


**Tabulka č.2.: Vliv H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( 13,6 mg/l) a Mg-ATP (1,522 g/l) na suspenzní kulturu šišáku bajkalského**

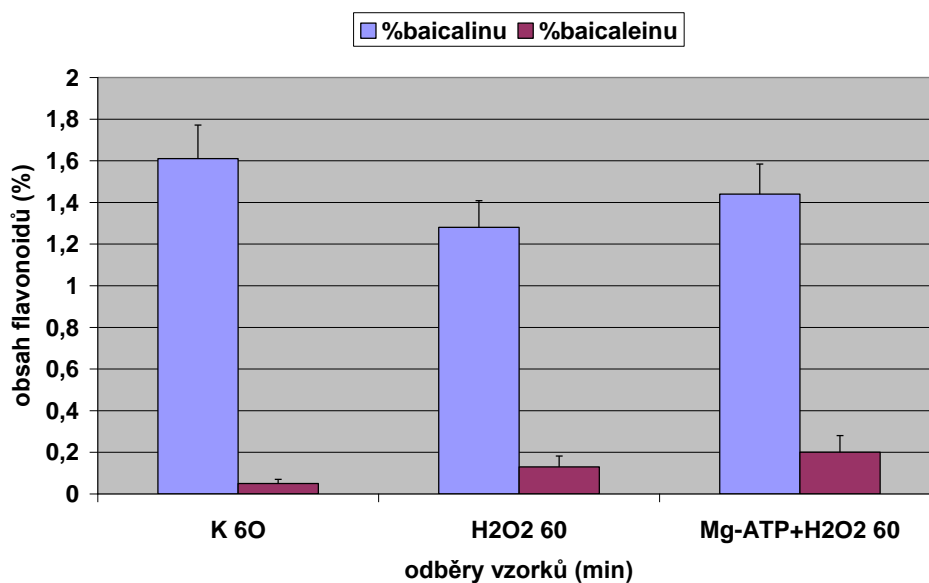
<b>Vzorek a doba odběru (min)</b>	<b>Baicalin (%)</b>	<b>Baicalein (%)</b>	<b>Teoretické množství 6,7-dehydrobaicaleinu (%)</b>
<b>K 30</b>	2,43	0,05	0,03
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30</b>	1,55	0,11	0,19
<b>Mg-ATP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30</b>	1,51	0,13	0,24
<b>K 60</b>	1,61	0,05	0,03
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60</b>	1,28	0,13	0,16
<b>Mg-ATP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60</b>	1,44	0,20	0,34
<b>K 180</b>	2,24	0,03	0,02
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 180</b>	1,58	0,06	0,20
<b>Mg-ATP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 180</b>	1,84	0,16	0,38
<b>K 300</b>	2,70	0,01	0,04
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300</b>	1,66	0,08	0,19
<b>Mg-ATP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300</b>	1,14	0,11	0,65

K = kontrola, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peroxid vodíku, Mg-ATP = hořečnatá sůl adenosintrifosfátu

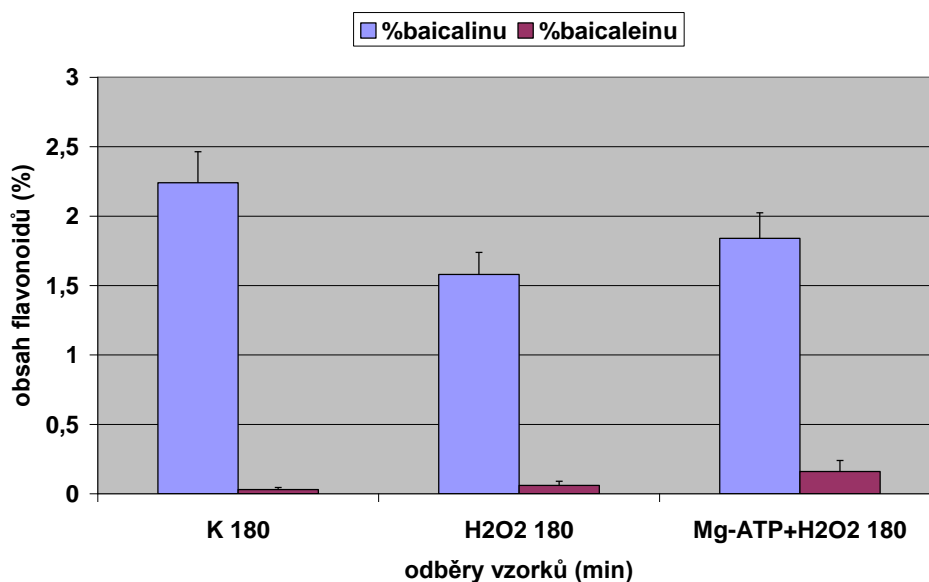
**Graf č. 4.: Vliv H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Mg-ATP na suspenzní kulturu šišáku bajkalského v čase 30 min**



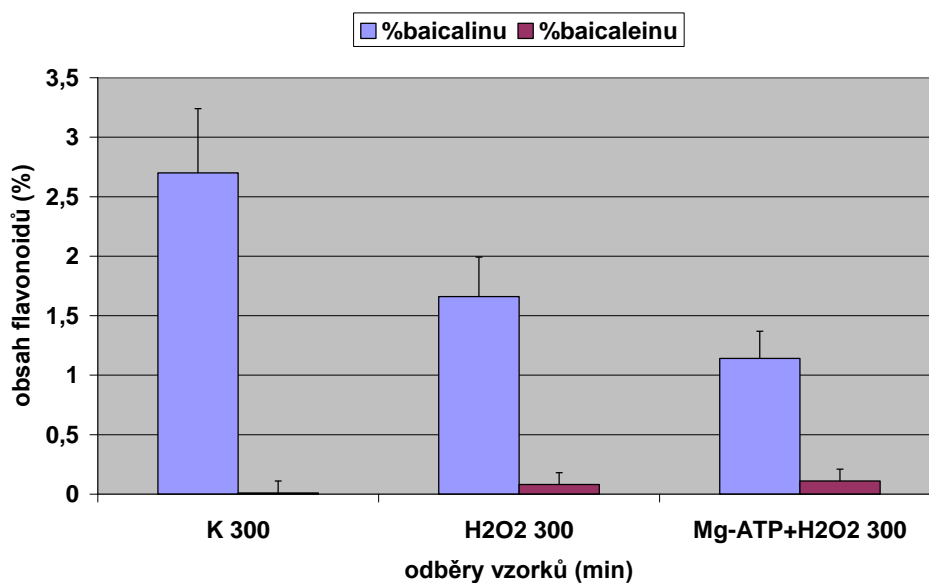
**Graf č. 5: Vliv H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Mg-ATP na suspenzní kulturu šišáku bajkalského v čase 60 min**



**Graf č. 6: Vliv H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Mg-ATP na suspenzní kulturu šišáku bajkalského v čase 180 min**



**Graf č. 7: Vliv H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Mg-ATP na suspenzní kulturu šišáku bajkalského v čase 300 min**





## 6. DISKUZE

Stejně jako u ostatních flavonoidů jsou i v šiřáku bajkalském flavonoidy syntetizovány pravděpodobně na endoplasmatickém retikulu. Baicalein je ve formě konjugátu s glutathionem transportován přes tonoplast do vakuoly, kde je na něj navázána cukerná složka (kyselina glukuronová) a mění se tak v baicalin.

Když je rostlinná buňka vystavena oxidačnímu stresu, baicalin zřejmě ztrácí cukernou složku, čímž se opět změní na baicalein a přestoupí přes tonoplast do cytosolu. V cytosolu baicalein reaguje s kyslíkovým radikálem a pomocí peroxidasy je přeměněn na 6,7-dehydrobaicalein.

Tato diplomová práce měla za cíl stanovit, zda je transport baicalinu z vakuoly do cytosolu závislý na přítomnosti Mg-ATP.

U suspenzní kultury šiřáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis* Georgii) byl testován vliv Mg-ATP v přítomnosti látek, které produkují kyslíkový radikál. Délky časových intervalů a koncentrace látek byly zvoleny na základě předchozích experimentů s elicitory - methylenovou modří a peroxidem vodíku. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1 a 2 a v grafech 1-7.

Jako producent kyslíkového radikálu byly použity dvě výše zmíněné látky – methylenová modř a  $H_2O_2$ .

Methylenová modř je ve vodě rozpustné barvivo, které se používá k barvení mikroskopických preparátů. Protože neprostupuje přes buněčnou stěnu živých buněk, nemůže elicitovat přímým zásahem do sekundárního metabolismu buňky, ale působí nepřímo jako generátor aktivních forem kyslíku.<sup>76)</sup> V přítomnosti světla a molekulárního kyslíku produkuje tato látka kyslíkový radikál a nepřímo i jiné aktivní formy kyslíku – peroxidy a superoxidy. Tyto aktivní formy kyslíku ohrožují buňky mimo jiné tím, že poškozují DNA.<sup>77, 78)</sup>

Princip působení peroxidu vodíku je podobný jako u methylenové modři – je to aktivní forma kyslíku. Po jeho přidání dojde k velkému nárazovému zvýšení

množství peroxidu v médiu, které se pomocí detoxikačních systémů buňky s postupem času snižuje.<sup>51)</sup>

Molekula adenosintrifosfátu (ATP) slouží jako zdroj energie pro řadu buněčných reakcí. V této diplomové práci byla při pokusu použita hořčnatá sůl adenosintrifosfátu. Pokud se Mg-ATP přidá k rostlinným buňkám, mělo by dojít ke zrychlení transportu látek přes tonoplast. Tuto hypotézu se snaží tato diplomová práce potvrdit.

Vliv samotné methylenové modři byl prezentován v disertační práci Jana Martina.<sup>51)</sup> V citované práci způsobila methylenová modř nárůst obsahu baicalinu po 8 a 24 hodinách.

Tyto výsledky byly potvrzeny a doplněny o údaje po 180 a 300 minutách (po 3 a 5 hodinách). Obsah baicalinu v těchto časech poklesl, ale po 1440 minutách (po 24 hodinách) opět vzrostl. Z výsledků obou prací tedy vyplývá, že k zahájení biosyntézy baicalinu dochází mezi 300 a 1440 minutami po elicitaci methylenovou modří.

Po přidání Mg-ATP a methylenové modři došlo v 180 minutě k radikálnímu snížení obsahu baicalinu a nárůstu baicaleinu. Výsledky tedy dokazují přímý vliv molekuly ATP na transport flavonoidu baicalinu z vakuoly do cytosolu a s tím spojenou hydrolýzu na baicalein a kyselinu glukuronovou. Po 300 a 1440 minutě již nebyl úbytek baicalinu tak výrazný, což se dá vysvětlit počínající syntézou baicalinu a doplněním jeho množství ve vakuolách. Vzhledem k různým výsledkům při použití samotné methylenové modři a methylenové modři s Mg-ATP lze konstatovat, že Mg-ATP výrazně ovlivňuje množství obou flavonoidů a pravděpodobně také transport přes membránu.

Vliv peroxidu vodíku a Mg-ATP nebyl výrazně jiný v porovnání s vlivem samotného peroxidu vodíku - množství baicalinu mírně pokleslo a množství baicaleinu mírně vzrostlo. U všech chromatogramů však byly pozorovány výrazné změny velikosti píku s retenčním časem 14 minut 15 vteřin. Tento pík výrazně narůstal s časem od elicitace s přidavkem Mg-ATP. Jedná se pravděpodobně

o 6,7-dehydrobaicalein, což je oxidační produkt baicaleinu, vniklý působením buněčných peroxidas a jehož vznik v buňkách *S. baicalensis* byl popsán v práci Morimota.<sup>57)</sup> U kontrolních vzorků a vzorků s peroxidem vodíku byla plocha tohoto píku konstantní a výrazně menší než u kultur s peroxidem vodíku a Mg-ATP. V přítomnosti Mg-ATP docházelo pravděpodobně k výraznému zvýšení baicaleinu, který však byl následně ihned oxidován na 6,7-dehydrobaicalein. I v těchto pokusech byl tedy pozorován vliv molekuly Mg-ATP na formu flavonoidů – způsobila pokles obsahu baicalinu v důsledku jeho přeměny na baicalein odštěpením kyseliny glukuronové na přenašeči.

Jak již bylo zmíněno, neznámý pík patří pravděpodobně oxidačnímu produktu - 6,7-dehydrobaicaleinu. Vyskytoval se nejen v pokusu s peroxidem vodíku, ale také v souvislosti s methylenovou modří. K velkému vzrůstu píku zde došlo po 180 minutách. Produkce baicaleinu v tomto čase byla tedy nejspíše mnohem vyšší, než jak naznačuje graf, protože většina uvolněného baicaleinu se okamžitě spotřebovala na odstranění oxidačního stresu, který způsobila methylenová modř. Neznámý pík (6,7-dehydrobaicalein) však nemohl být přesně kvantifikován, protože standard 6,7-dehydrobaicaleinu není komerčně dostupný. Teoretické množství této látky bylo vypočteno z kalibrační křivky baicaleinu (obr. 8 dole) a je uvedeno v tabulkách 1 a 2.

## 7. ZÁVĚR

1. Byla zvládnuta kultivace suspenzní kultury šiřáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis* Georgii, *Lamiaceae*) a HPLC analýza baicalinu a baicaleinu.

2. Byl sledován vliv Mg-ATP a elicitoru na množství baicalinu a baicaleinu.

a) Na transport flavonoidů měl největší vliv přídavek Mg-ATP a methylenové modři po 180 minutách od přidání do média. Množství baicalinu se oproti kontrole (2,47 %) snížilo na 0,8 %, množství baicaleinu se zvýšilo z 0,01 % na 0,21 %. Obsah neznámé látky (pravděpodobně 6,7-dehydrobaicalein) vzrostl v tomto čase z 0,05 % na 0,7 %. Další výrazný vliv byl zaznamenán v čase 1440 minut, kdy obsah baicalinu poklesl z 1,84 % na 1,11 % a obsah neznámé látky vzrostl z 0,03 % na 0,07 %.

b) Mg-ATP přidaný společně s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> měl největší vliv na transport flavonoidů v čase 300 minut, kdy se množství baicalinu ve srovnání s kontrolou snížilo z 1,66 % na 1,14 % a množství baicaleinu vzrostlo z 0,08 % na 0,11 %. Neznámý pík vzrostl v tomto čase z 0,19 % na 0,65 %.

Z výsledků vyplývá, že Mg-ATP mělo pozitivní vliv na rychlost transportu baicalinu z vakuoly do cytosolu. Transportní mechanismus pro baicalin tedy pravděpodobně náleží k MRP proteinům, které jsou podskupinou ABC transportérů.

## 8. LITERATURA

1. Hsu H. Y.: *Oriental Materia Medica a conside guide*, Oriental Healing Art Institute, Long Beach 1986, s. 152.
2. Valíček P. et al.: *Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny*, Svítání, Hradec Králové 1998, s. 244.
3. Brekhman I. I., Grinevitch M. A., Kyu K. B.: *Am. J. Chin. Med.* 9, 134 (1981).
4. Hoffman D.: *The Herbal Handbook: A User's Guide to Medical Herbalism*, Healing Arts Press, Orchester 1988, s. 77.
5. Cuellar M. J. et al.: *Fitoterapia* 72, 221 (2001).
6. Zhang Y. Y. et al.: *Biomed. Chromatogr.* 12, 31 (1998)
7. Duke J. A.: *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*, internet <http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=915> (15. 3. 2007)
8. Kazautaka N. et al.: *Phytochemistry* 52, 885 (1999)
9. Zhang Y. Y. et al.: *J. Chin. Pharm. Sci.* 6, 182 (1997)
10. Miyaichi Y., Tomimori T.: *Nat. Med.* 52, 82 (1998)
11. Hara H. et al.: *Eur. J. Pharmacol* 221, 193 (1992)
12. Hamada H., Hiramatsu M., Mori A.: *Arch. Biochem. Phys.* 306, 261 (1993)
13. Gao Z. et al.: *Appl. Magn. Reson.* 19, 35 (2000)
14. Yhao Z. H. et al.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1885 (1999)
15. Gao Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 643 (1999)
16. Gao Z., Juany K., Xu H. B.: *Pharmacol. Res.* 43, 173 (2001)
17. Gao D. et al.: *Res. Commun. Mol. Phatol. Pharmacol.* 90, 103 (1995)
18. Lim B. O. et al.: *Phytoterapy Res.* 16, 479 (1999)
19. Gabrielska J. et al.: *Z. Naturforsch.* 52, 817 (1997)

20. Chen Z. Y. et al.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 73 (2000)
21. Parmentier J. H. et al.: *Hypertension* 37, 623 (2001)
22. Natarajan R. et. al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90, 4947 (1993)
23. Kisch E. S. et. al.: *Hypertension* 29, 796 (1997)
24. Wen Y. et al.: *Circulation Res.* 88, 70 (2001)
25. He Q., La Pointe M. C.: *Ethnopharmacology* 21, 209 (1987)
26. Chi Y. S., Chrom B. S., Kim H. P.: *Biochem. Pharmacol.* 61, 1195 (2001)
27. Konoshima T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 531 (1992)
28. Nagai T. et al.: *Antivir. Res.* 19, 207 (1992)
29. Liu I. X., Durham D. G., Richards R. M. E.: *J. Pharm. Pharmacolog.* 52, 361 (2000)
30. Tsao T. F. et al.: *J. Dent. Res.* 61, 1103 (1982)
31. Konoshima T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 531 (1992)
32. Lee B. H. et al.: *Planta Med.* 66, 70 (2000)
33. Kim B. R. et al.: *Planta Med.* 67, 396 (2001)
34. Chan F. L. et al.: *Cancor Lett.* 160, 219 (2000)
35. Lee M. J. et. al.: *Nutr. Cancer* 34, 185 (1999)
36. S. F. V. et al.: *Cancor Lett.* 112, 127 (1997)
37. Smolianinov E. S. et al.: *Eksp. Klin. Farmakol.* 60, 49 (1997)
38. Goldberg V. E. et al.: *Eksp. Klin. Farmakol.* 97, 28 (1997)
39. Hiu K. M., Wang X. H., Xue H.: *Planta Med.* 66, 91 (2000)
40. Hui K. M. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 64, 1415 (2002)
41. Huen M. S. Y. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 66, 125 (2003)
42. Liao J. T. et al.: *Planta Med.* 64, 571 (1998)
43. Kimura Y., Okuda H., Ogita Z.: *J. Nat. Prod.* 60, 598 (1997)
44. Chen Z. Y. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 374, 41 (1999)
45. Nakajima T. et al.: *Planta Med.* 67, 132 (2001)
46. Sieh D. E., Liu L. T., Liu C. C.: *Anticancer Res.* 20, 1861 (2000)

47. Kyo R. et al.: *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 1179 (1998)
48. Nagao M. et al.: *Environ. Mutagen* 3, 401 (1981)
49. D'Arcy P.: *Averse Drug React Toxicol. Rev.* 12, 147 (1993)
50. Dewick P. M.: *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, J. Wiley and Sons Ltd., Chichester 1997, s. 136
51. Martin J.: *Disertační práce*, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2006, s. 27 a násl.
52. Pauls K. P. *Biotechnol. Adv.* 13, 673 (1995)
53. Kováč J.: *Explantátové kultury rostlin*, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s.13
54. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962)
55. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K.: *Exp. Cel. Res.* 50, 151 (1968)
56. Schenk E. U., Hildebrandt A. C.: *Can. J. Bot.* 50, 199 (1972)
57. Morimoto S. et al.: *J. Biol. Chem.* 263, 12606-12611, 273 (1988)
58. Procházka S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1998, s. 412
59. Chasan R.: *Plant Cell* 7, 495 (1995), In: Řimáková J.: *Disertační práce*, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2005, s. 49
60. Dörnenburg H., Knorr D.: *Enzyme Mikrob. Tech.* 17, 674 (1995)
61. Ebel J., Mithöfer A.: *Planta* 206, 335 (1998)
62. C. F. Higgins: *Annu Rev. Cell Biol.* 8, 67-113 (1992)
63. P. A. Rea et al.: *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 49, 727-760 (1998)
64. C. F. Higgins, M. M. Gottesman: *Trends Biochem. Sci.* 17, 18-21 (1992)
65. K. A. Marrs et al.: *Nature* 375, 397-400 (1995)
66. C. C. Smart, A. J. Trewavas: *Plant Cell. Environ.* 6, 507-514 (1983)
67. K. Chaloupková, C. C. Smart: *Plant Physiol.* 105, 497-507 (1984)
68. J. E. Walker et al.: *EMBO J.* 1, 945-951 (1982)
69. C. F. Higgins et al.: *Nature* 323, 448-450 (1986)

70. T. W. Loo, D. M. Clarke: *J. Biol. Chem.* 270, 843-848 (1995)
71. T. W. Loo, D. M. Clarke: *J. Biol. Chem.* 271, 15414-15419 (1996)
72. C. Kast et al.: *Biochemistry* 34, 4402-4411 (1995)
73. E. Bakos et al.: *J. Biol. Chem.* 271, 12322-12326 (1996)
74. D. R. Hipfner et al.: *J. Biol. Chem.* 272, 23623-23630 (1997)
75. M. Klein et al.: *Phytochemistry* 56, 153-159 (2001)
76. Sakaki H. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 338 (2002)
77. Epe B., Pflaum M., Boiteux S.: *Mutat. Res-Gen. Tox. En.* 299,135  
(1993)
78. Tuite E. M., Kelly J. M.: *J. Photoch. Photobiol. B* 21, 103 (1993)
79. H. A. Walczak, J. V. Dean: *Phytochemistry* 53, 441-446 (2000)