

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMAKOLOGIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Vliv derivátů pyrazinu na obsah sekundárních  
metabolitů v in vitro kulturách rostlin II.**

**TEREZA HANZLÍKOVÁ**

**Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2020**

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc., za cenné rady a odborné vedení při vypracování mé diplomové práce. Poděkování patří i panu PharmDr. Petrovi Kastnerovi, Ph.D. za pomoc při stanovení výsledků pomocí HPLC analýzy a také týmu katedry farmakognozie za pomoc při provádění experimentální části diplomové práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, červen 2020

Tereza Hanzlíková

# 1. OBSAH

UNIVERZITA KARLOVA.....	1
2. ÚVOD .....	6
3. CÍL PRÁCE .....	7
4. TEORETICKÁ ČÁST .....	8
4.1 Třezalka tečkovaná .....	8
4.1.1 Charakteristika a taxonomické zařazení .....	9
4.1.2 Obsahové látky .....	9
4.1.3 Biologické účinky, použití a klinické studie .....	12
4.1.4 Lékové interakce .....	13
4.1.5 Nežádoucí účinky.....	14
4.2 Explantátové kultury.....	15
4.2.1 Charakteristika .....	15
4.2.2 Výhody a využití .....	15
4.2.3 Druhy explantátových kultur .....	16
4.3 Faktory ovlivňující růst <i>in vitro</i> .....	18
4.3.1 Živná média .....	18
4.3.2 Fyzikální podmínky kultivace.....	22
4.4 Fyziologie stresu u rostlin .....	23
4.4.1 Stresové reakce a stresové faktory .....	23
4.4.2 Společné mechanismy stresových reakcí .....	24
4.5 Elicitace.....	27
4.5.1 Elicitory.....	27
4.5.2 Mechanismy elicitace .....	29
4.5.3 Faktory ovlivňující elicitaci .....	29
4.6 Pyraziny.....	30
4.7 Pyrazinové deriváty jako abiotické elicitory .....	32
4.7.1 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid .....	33
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
5.1 Použité chemikálie .....	34
5.2 Pomůcky a přístrojové vybavení.....	35
5.3 Rostlinný materiál.....	36
5.4 Příprava a složení živného média .....	36
5.5 Příprava kalusových kultur .....	38
5.6 Příprava suspenzních kultur.....	38
5.7 Příprava elicitoru.....	38
5.8 Elicitace <i>in vitro</i> kultur .....	39
5.9 Stanovení obsahu.....	39

5.9.1	HPLC analýza .....	40
5.10	<i>Statické zpracování výsledků</i> .....	42
5.10.1	Aritmetický průměr .....	42
5.10.2	Směrodatná odchylka .....	43
5.10.3	T-test .....	43
<b>6.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>45</b>
6.1	<i>Tabulky</i> .....	45
6.2	<i>Grafy</i> .....	52
6.2.1	Kalusové kultury .....	52
6.2.2	Suspenní kultury .....	53
6.2.3	Kalusová média .....	54
6.2.4	Suspenní média.....	56
<b>7.</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>61</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>62</b>
<b>10.</b>	<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>67</b>
<b>11.</b>	<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>68</b>

## 2. ÚVOD

Vyšší rostliny patří mezi jedny ze základních zdrojů výživy, kromě toho produkují mnoho bioaktivních sloučenin, které mají široké uplatnění ve farmaceutickém průmyslu.

Je dokázáno, že více jak čtvrtina obyvatelstva ve vyspělých zemích využívá k terapii léčiva přírodního nebo polosyntetického původu. Snahou je nahradit přírodní látky syntetickými molekulami se stejnou účinností a srovnatelnými farmakologickými vlastnostmi dané látky. Syntéza těchto struktur je drahá, časově náročná a vzhledem ke komplikovaným strukturám přírodních látek často neuskutečnitelná.

Jednou z možností jak získat sekundární metabolity snadněji než z intaktní rostliny je biotechnologickou produkcí v rostlinných kulturách *in vitro*. Produkce v *in vitro* kulturách byla zkoumána u více druhů, ale jen u malého počtu kultur byla zaznamenána zvýšená produkce sekundárních metabolitů, příčinou může být nedostatečná znalost probíhajících dějů nebo špatná stabilita kultur. Nadějí na zvýšení produkce sekundárních metabolitů *in vitro* je elicítace, kdy elicitor působí jako stresor a v důsledku obranné reakce rostliny dochází ke zvýšené produkci obsahových látek<sup>1,2</sup>.

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je seznámit se s metodou kultivace explantátových kultur *in vitro*. Určit vliv 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamidu jako abiotického elicitoru na produkci flavonoidů a antracenových derivátů v kalusové a suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. Pomocí analytické metody HPLC zjistit, zda daný elicitor ovlivňuje produkci výše zmíněných sekundárních metabolitů v kultuře *in vitro* a zároveň určit, zda dochází k jejich uvolňování do živného média.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 Třezalka tečkovaná



**Obrázek 1. Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.)<sup>3</sup>**

Lidově nazývaná jako krevníček, postřelenec a svatojánská bylina. Třezalce tečkované se také přezdívá kvítí sv. Jana nejen proto, že vykvétá 24. května na svátek sv. Jana Křtitele, ale také se k ní váže legenda o tom, že když přinesli zuřivé Héroidané na míse hlavu sv. Jana Křtitele, propíchlala ve vzteku jeho jazyk a údajně z krve steklé na zem vyrostla rostlina (třezalka tečkovaná). Propíchané listy s červenými tečkovitými žlázkami mají připomínat tento ukrutný čin<sup>4,5</sup>.

Z historie je známo, že už v období antiky se třezalka tečkovaná využívala v léčbě melancholie a hojení ran. Její účinky jako první poznamenal slavný lékař Hippokrates (460- 377 př. n. l.). Paracelsem byla zmíněna v léčbě depresivních poruch. Ve středověku ji lidé používali jako rostlinu chránící před démony, čarodějnicemi a ďáblem<sup>5</sup>.

### 4.1.1 Charakteristika a taxonomické zařazení

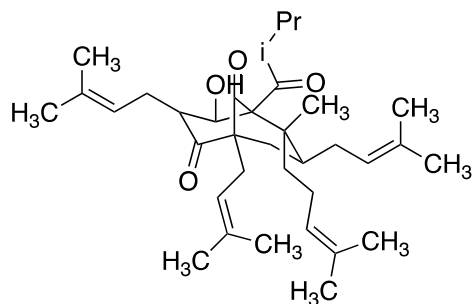
Třezalka tečkovaná patří do čeledi Třezalkovité (*Hypericaceae*), řádu Čajovníkotvaré (*Theales*), třídy (*Rosopsida*). Je to vytrvalá, statná bylina a může dorůstat do výšky až šedesáti centimetrů, výjimečně do jednoho metru. Vyskytuje se od nížin do podhorských oblastí, upřednostňuje však sušší louky, výslunné stráně a lesní paseky. Nachází se po celé Evropě a Asii, introdukovaná byla až do Severní Ameriky. Roste od května do září. Lodyhy jsou vystoupavé až přímé, v horní části mají alespoň dvě vyniklé lišty. Listy jsou řapíkaté nebo přisedlé, podlouhlé nebo vejčité, na světle jsou na nich vidět červené tečkovité žlázy obsahující barviva hypericin a pseudohypericin, někdy nazýváno jako krev sv. Jana. Při rozemnutí mezi prsty barví červeně. Kromě červenofialového barviva obsahují i třísloviny, provitamin A a vitamin C, silice, flavonoidní glykosidy. Vrcholičnatá květenství jsou bohatá a zlatožlutá, která dorůstají až do průměru 15-35mm, zato korunní lístky mají téměř poloviční délku. Červené žlázy se vyskytují i na korunních lístcích. Plodem je tobolka. Třezalka se hojně využívá hlavně v lidovém léčení jako přírodní antibiotikum v léčbě ekzémů. Sbírá se především nať, která se suší za běžné teploty, zavěšená ve stínu. Zajímavou rostlinou se stala i pro řadu alchymistů, kteří zkoumali schopnost přeměny zelené rostliny na červený olej. Na území České republiky se nacházejí i jiné druhy obsahující však méně účinných látek než třezalka tečkovaná - patří mezi ně třezalka skvrnitá nebo třezalka čtyřkřídla<sup>4,5</sup>.

Třezalková nať (*Herba hyperici*) je uvedena v českém lékopisu jako droga, získaná usušením celých nebo řezaných kvetoucích vrcholů *Hypericum perforatum* L. Musí obsahovat nejméně 0,08 % hypericinů (bráno jako hypericin), aplikováno na usušenou drogu<sup>6</sup>.

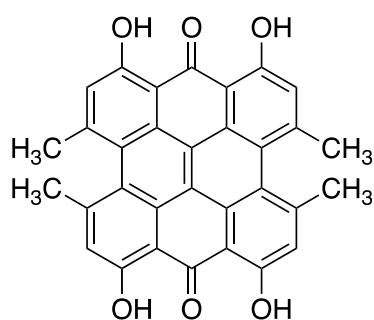
### 4.1.2 Obsahové látky

- Naftodianthrony (hypericin, pseudohypericin, isohypericin, cyclopseudohypericin, protohypericin)
- Floroglucinoly (hyperforin, adhyperforin)
- Flavonoidy (kvercetin, isokvercetin, hyperosid, rutin, amentoflavon)
- Fenolické kyseliny (chlorogenová kyselina, kávová kyselina)
- Xantony
- Třísloviny (catechin, epicatechin)
- Aminokyseliny (kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, melatonin)
- Silice (2-methyloktan, undekan,  $\beta$ -pinen)
- Nasycené mastné kyseliny (kyselina isovalerová, kyselina myristová)<sup>7,8</sup>

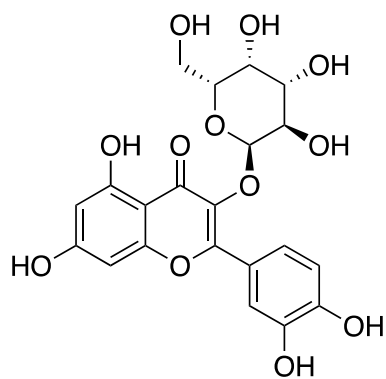
Chemické struktury obsahových látek třezalky tečkované (*Hypericum perforatum* L.)<sup>9</sup>:



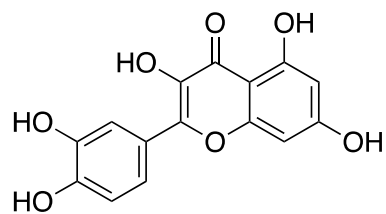
**Obrázek 2. Hyperforin**



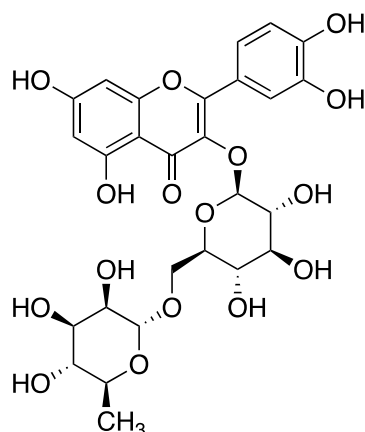
**Obrázek 3. Hypericin**



**Obrázek 4. Hyperosid**



**Obrázek 5. Kvercetin**



**Obrázek 6. Rutin**

#### **4.1.2.1 Naftodianthrony**

Jsou zastupitelné zejména hypericinem a pseudohypericinem, který je zodpovědný za rudou barvu oleje připomínající krev<sup>10</sup>. Obě obsahové látky inhibují monoaminoxidázu A, proteinkinázu C a účinkují jako inhibitory zpětného vychytávání serotoninu<sup>10</sup>.

Vzhledem ke své struktuře je hypericin velice fotoreaktivní. Biochemicky je hypericin polycyklický chinon, který má v blízkosti karbonylových násobných vazeb hydroxylové funkční skupiny<sup>11</sup>.

Hypericin je znám hlavně díky svému fotosenzitivnímu účinku, který je využíván v léčbě protinádorových onemocnění. Jelikož ale patří do skupiny naftodianthronů, u nichž je známá špatná rozpustnost ve fyziologických roztocích a produkce nefluorescenčních agregátů, byla proto studována fytochemická aktivita v lipidových nanokapslích, kde byla zjištěná zvýšená rozpustnost, tvorba singletového kyslíku a snížená tvorba agregátů. Zkoumala se také aktivita na nádorové buňky karcinomu děložního čípku a ledvin, kde byla jejich životaschopnost výrazně snížena<sup>12</sup>.

Studie ukazují, že hypericin by mohl být využit k potenciaci morfinové analgezie z důvodu snížení dávek morfinu k vyvolání analgetického účinku<sup>13</sup>.

#### **4.1.2.2 Fluoroglucinoly**

Hlavními zástupci fluoroglucinolů je hyperforin a adhyperforin<sup>10</sup>. Hyperforin je prenylovaný fluoroglucinol substituovaný několika lipofilními izoprenovými řetězci. Je nestabilní v přítomnosti světla a kyslíku<sup>11</sup>. Hyperforin je známý zejména v léčbě deprese. Také ale vykazuje antibakteriální, antiproliferativní a antiangiogenní aktivitu. Zvýšená biologická aktivita byla zjištěna i u jeho derivátů. Klinické aplikace jsou však omezeny z důvodu hydrofobní charakteristik a nestability molekuly<sup>14</sup>. Důležitá role je v léčbě atopického ekzému a narušené pokožky. K úplnému účinku je ale zapotřebí dlouhodobá a pravidelná aplikace<sup>15</sup>.

### 4.1.3 Biologické účinky, použití a klinické studie

Třezalka tečkovaná se používá při řadě obtíží, ceněna je však pro svůj antidepresivní účinek, který se nejvíce přikládá obsahové látce hyperforin, který inhibuje zpětné vychytávání serotoninu, noradrenalinu, dopaminu a způsobuje sníženou regulaci kortikálních beta-adrenergických a 5-HT<sub>2</sub> receptorů<sup>16</sup>. Bylo také zjištěno, že inhibuje zpětné vychytávání L-glutamátu a zvyšuje koncentraci intracelulárního Na<sup>+</sup><sup>10</sup>. Třezalka je využívána v léčbě lehkých až středně těžkých depresivních poruch a je srovnatelná s účinkem tricyklických antidepresiv (TCA), ale na rozdíl od TCA je třezalka tečkovaná charakterizovaná menším výskytem nežádoucích účinků<sup>17</sup>.

Aktuální přípravky, jako jsou oleje nebo tinktury, se využívají v léčbě menších ran, popálenin, odřenin, modřin, pohmožděnin a vředů<sup>18</sup>.

Roztroušená skleróza je onemocnění nervové soustavy projevující se zánětem, demyelinizací a axonálním poškozením. Třezalka tečkovaná je známá nejen pro své antidepresivní, ale i protizánětlivé účinky, které by mohly příznivě ovlivnit prognózu tohoto onemocnění. Testování účinku hyperforinu a extraktů z třezalky tečkované bylo prováděno u experimentálně navozené autoimunitní encefalomyelitidy vyvolané specifickými antigeny na zvířecích modelech. Efekt hyperforinu na regulaci T-buněk byl hodnocen pomocí průtokové cytometrie. Výsledky naznačují, že hyperforin a extrakty z třezalky tečkované mohou oslabit autoimunitní odpověď myeloidní encefalomyelitidy, pomocí snížené infiltrace imunitních buněk a expanze Treg buněk a mohly by být považovány za potenciálního kandidáta v léčbě roztroušené sklerózy<sup>19</sup>.

Dalším nepodloženým, dlouho diskutovaným účinkem byl vliv na krátkodobou paměť u zdravých dospělých jedinců. Jednorázová, randomizovaná dvojitě zaslepená placebem kontrolována studie ukázala, že malé dávky (250mg) mají vliv na zlepšení krátkodobé verbální paměti a doporučuje se podávání malých dávek v nootropických aplikacích<sup>20</sup>.

Extrakty z třezalky tečkované byly testované na kulturách nádorových buněčných linií erytroleukémie. V přítomnosti extraktů s hypericinem byl sledován růst buněk a indukce apoptózy pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. Zajímavostí je, že některé extrakty během kultivace si dokázaly zachovat svou účinnost nebo ji dokonce zvýšit, zatímco u jiných došlo k její ztrátě. Výsledky studií ukazují, že extrakty z třezalky tečkované inhibují růst buněk K562 a indukují apoptózu v závislosti na původu rostliny<sup>21</sup>.

Třezalka působí jako agonista na estrogenních receptorech a tím pomáhá snižovat nepříjemné projevy během menopauzy. Fotosenzibilní účinky jsou přisuzované hlavně hypericinu. Studie prováděné na základě zjišťování preventivního účinku třezalky na rakovinu prsu zkoumaly hlavně proliferaci, životaschopnost buněk a jejich apoptózu. Celkové výsledky dokazují, že třezalku lze použít jako chemicko-preventivní činidlo zastavující proliferaci a indukující apoptózu inhibicí AMPK/mTOR a aktivací mitochondriální dráhy<sup>22</sup>.

Nejčastější příčinou zubního kazu v raném dětství bývají laktobacily. Cílem studií bylo zjistit, zda hypericinový extrakt vykazuje antibakteriální účinky na kmeny *Lactobacillus* spp. Antimikrobiální účinky byly prokázány i se stanovením MIC (minimální inhibiční koncentrace),

kteřá zároveň nepůsobila toxicky na gingivální fibroblastové buňky. Hypericinový extrakt by mohl být zvolen jako náhrada ústních vod, které na rozdíl od extraktu nejsou schopny odstranit kyseliny produkující kmeny v ústech<sup>23</sup>.

Jak už je známo, rakovina pankreatu je jednou z nejagresivnějších malignit s nízkou mírou přežití. Současná studie je zaměřena na zkoumání protinádorových účinků hyperosidu v lidských rakovinných buňkách pankreatu. Výsledky *in vitro* ukázaly, že hyperosid podporoval apoptózu buněk dvou různých linií lidské rakoviny slinivky břišní, což korelovalo se zvýšenou regulací poměrů Bax / Bcl-2 a se sníženou regulací hladin jaderného faktoru-kB a NF-kB's. Navíc pomocí lidského modelu slinivky břišní se zjistilo, že hyperosid také významně inhiboval růst nádoru. Experimenty ukazují, že hyperosid by mohl být slibným kandidátem pro léčbu rakoviny pankreatu<sup>24</sup>.

Virus chřipky je onemocnění postihující dýchací systém. I přes dostupnost veškerých vakcín a existenci léku potlačující virus je potřeba vyvinout nová antivirotika zabraňující přenosu viru a rozvoji onemocnění. Dalším důvodem pro vývoj antivirotik jsou obavy ze vzniku rezistence. Při studiu polyfenolů byly zjištěny jejich antioxidační a antikarcinogenní účinky, některé dokonce vykazovaly antivirovou aktivitu, proto došlo k testování na virus chřipky A a B. Mezi testovanými byl i isokvercetin, který významně inhiboval replikaci viru A a B při nejnižší použité koncentraci. Při duálním podání s oseltamavirem nebo amantadinem došlo k potlačení vzniku rezistentního viru způsobeného těmito léky<sup>25</sup>.

#### 4.1.4 Lékové interakce

V současné době jsou bylinné léčivé přípravky velice oblíbené. Jednak pro svoji účinnost, ale zejména pro svoji relativně nízkou cenu a malý výskyt nežádoucích účinků. Jsou však schopny ovlivnit farmakokinetiku a farmakodynamiku současně podávaných léčiv<sup>26</sup>. Lékové interakce jsou hlášeny obzvláště u léčiv, které jsou substrátem cytochromu P-450 isoenzymů CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 nebo P-glykoproteinu<sup>27</sup>. CYP 3A4 je schopen ovlivnit metabolismus asi 37 léků<sup>17</sup>. Při indukci těchto enzymů hraje roli zejména obsahová látka hyperforin. Mezi nejčastěji interagující léčiva s třezalkou tečkovanou patří zejména imunosupresiva, protirakovinná a kardiovaskulární léčiva a léčiva snižující cholesterol.

Příčina interakcí je přikládána hlavně hyperforinu, takže léčivé přípravky bez hyperforinu by mohly být potenciálem pro snížení interakcí<sup>28</sup>.

Kromě indukce je znám i inhibiční účinek obsahových látek třezalky tečkované na CYP 2D6. Tato interakce může při společném podání s inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (sertralin, paroxetin) vyústit v tzv. serotoninový syndrom<sup>29</sup>. Mezi jeho typické projevy patří pocení, horečka, tachykardie, zvýšený krevní tlak, vzestup motorické aktivity, podrážděnost<sup>17</sup>. Jednou ze známých interakcí je společné podání s kontraceptivy, která jsou substrátem cytochromu P-450 s třezalkou tečkovanou jakožto silným induktorem cytochromu P-450. Srovnávací studie prokazují, že při této kombinaci je zvýšené riziko ovulace a průlomového krvácení<sup>30</sup>.

Cílem studie bylo zjistit změnu farmakokinetiky bupropionu (substrátu cytochromu P-450 isoenzymu 2B6) po jeho jednorázovém podání za nepřetržitého užívání třezalky.

Experimenty byly provedeny na zdravých dobrovolnících, kde bylo zjištěno, že během interakce dochází ke snížení plazmatické koncentrace bupropionu, pravděpodobně zvýšením jeho clearance<sup>31</sup>.

Byla zaznamenána i interakce u pacienta užívajícího běžně warfarin, který po užití třezalky skončil na pohotovosti s gastrointestinálním krvácením. Zajímavostí je, že při této interakci by mělo dojít spíše k sníženému účinku warfarinu vlivem zvýšeného metabolismu přes enzymatický systém cytochromu P-450. V tomto případě ovšem došlo k opačnému ději, kdy byla zvýšena hladina INR, která se projevila zvýšeným krvácením<sup>32</sup>.

Ačkoliv u třezalky nedošlo k prokázání inhibice monoaminoxidázy, není doporučena kombinace s látkami obsahující tyramin (neselektivní inhibitor MAO), mohlo by dojít k hypertenzní krizi, tzv. sýrové reakci<sup>17</sup>.

#### 4.1.5 Nežádoucí účinky

Třezalka bývá obecně dobře tolerovaná a incidence nežádoucích účinků s jejím užíváním bývá obecně nízká ve srovnání s ostatními antidepresivy<sup>33</sup>. Studie, které sledovaly hlášení nežádoucích účinků po užívání typických antidepresiv (SSRI) ve srovnání s třezalkou tečkovanou zjistily, že bylinné přípravky mohou vést k podobným nežádoucím účinkům jako u léků na předpis<sup>34</sup>.

Kromě lehkých a středně těžkých depresí je třezalka užívaná v depresivních stavech během gravidity. Při testování nežádoucích účinků při dávce 1g/kg/den nebyly u mláďat králíka zaznamenány žádné vývojové vady a ani u matky nebyla narušena schopnost reprodukce. Užívání třezalky během laktace může mít neblahý vliv na kojence, v podobě koliky a letargie. *In vitro* pokusy dokázaly vyvolání teratogenního efektu při užití třezalky s obsahem hypericinu, které u člověka nebyly zaznamenány. Užívání během kojení není přísně kontraindikováno, přesto byl zaznamenán přestup hyperforinu do mateřského mléka a vedlejší účinky v podobě letargie a koliky u kojenců<sup>35</sup>. V období těhotenství a laktace je doporučeno třezalku neužívat z důvodu málo provedených kvalitních studií<sup>25</sup>.

Přes veškeré studie dokazující účinnost *Hypericum perforatum*, nikdy nebyl zkoumán vliv na psychotické stavy. V nedávné době byl hlášen případ výskytu psychózy u mladíka, který se neléčil s žádnou psychózou a ani nebyla evidována rodinná anamnéza s psychotickou depresí. Mělo by se proto dbát na opatrnost při podávání fytoterapeutik, jako je *Hypericum*<sup>37</sup>.

Mezi vzácný nežádoucí účinek patří fototoxicita, která se projevuje puchýřky podobným popáleninám, doprovázené svěděním. Riziková může být u pacientů trpících epilepsií, kde může dojít k vyvolání epileptického záchvatu. Zvýšenou vnímavost a změny kožní pigmentace pozorujeme až při podání jednorázové dávky 3600mg nebo při polovičních dávkách po dobu 14 dnů<sup>38</sup>. Fototoxickou kožní reakci přikládáme obsahové látce hypericin<sup>39</sup>. Z tohoto důvodu by se mělo zamezit kombinaci s určitými látkami jako je piroxikam a tetracyklin<sup>17</sup>.

Třezalka byla také testovaná na ovlivnění glukózové tolerance u zdravých mužů. Výsledky studií zjistily, že léčba třezalkou tečkovanou zvyšuje celkovou a přírůstkovou AUC (plochu pod křivkou) glukózy. Citlivost na inzulin zůstala zachována na rozdíl od sekrece inzulinu, která byla

výrazně snížena. Závěrem lze říci, že její nadměrné užívání může zhoršit *diabetes mellitus* typu 2 a glukózovou toleranci<sup>40</sup>.

## 4.2 Explantátové kultury

### 4.2.1 Charakteristika

Pěstovat rostliny můžeme jak v přirozených, tak v umělých podmínkách, kde dochází k odběru parenchymatické tkáně z různé části rostliny a přenesení do skleněných nádob. Kultivace *in vitro* umožňuje pěstovat jak celistvé, tak jednotlivé části rostlin. Z dostatečně narostlé kultury lze vytvořit nové kultury přenesením explantátu na čerstvě vytvořené živné médium. Existence explantátových kultur je založena na tzv. totipotenci rostlinné buňky, která je přikládána všem buňkám obsahující nepoškozené jádro s možností obnovovat buněčné dělení a diferenciaci. Schopnost totipotence je přikládána hlavně zygotě, která při mitotickém dělení a diferenciaci dceřiných buněk umožňuje tvorbu nových pletiv<sup>2,41</sup>.

Kultivace *in vitro* musí probíhat za aseptických a přesně definovaných podmínek. Totipotence umožňuje odběr explantátu z kterékoli části. Vhodným výběrem explantátu je možné ovlivnit osud explantátové kultury. Volba odběru záleží na druhu narostlé kultury, typu kultury, která se bude pěstovat a funkci, pro kterou je vytvářena. Důležité je, aby rostlina sloužící k odběru nebyla zdrojem kontaminace pro novou kulturu, proto by měla být zachována sterilita. Živné médium obsahující velké množství živin je vhodným prostředím pro růst mikroorganismů a důvodem pro zachování aseptického prostředí<sup>42,43</sup>.

První zmínka o pěstování explantátových kultur pochází od Haberlandta ze začátku 20. století. Na rozdíl od jeho předchůdců zabránil vytvořením aseptických podmínek zvýšenému zániku explantátových kultur, ale pro optimální růst a vývoj kultury nebyla zajištěna přítomnost všech potřebných složek v živném médiu. Přidáním kvasničného extraktu do živného média zajistil White v roce 1934 schopnost neustálého dělení a diferenciaci buněk i při přenosu na nově připravenou živnou půdu. Od této události dochází prováděním pokusů k neustálému rozšiřování poznatků o explantátových kulturách<sup>44</sup>.

### 4.2.2 Výhody a využití

Rostliny pěstované v přirozených podmínkách vyžadují pro svůj růst určité klimatické podmínky a roční období, které u kultur *in vitro* nehrají roli. Obsahuje-li živné médium dostatečné množství živin a růstových regulátorů je možné mnohonásobně zvýšit produkci sekundárních metabolitů a udržet existenci kultury dostatečně dlouhou dobu.

Běžně rostoucí rostliny potřebují větší prostory pro optimální růst na rozdíl od kultur *in vitro*, kde i přes limitaci velikosti laboratoře je možné pěstovat velké množství kultur na malém prostoru. Totipotence rostlinné tkáně umožňuje odebrání velkého množství vzorků z odlišných částí matečné rostliny a vytvoření tak velké buněčné kolonie.

Vzhledem ke kultivaci *in vitro* tedy ve skleněných nádobách není zapotřebí pletí ani povrchového ošetřování kultur chemickými látkami před škůdci. Vzhledem k obsahu velkého

množství živin v médiu, což je ideální prostředí nejen pro růst rostlin, ale i mikroorganismů, je důležité dodržování aseptických podmínek.

Hlavní nevýhodou je finanční náročnost laboratorního vybavení. Přesazování kultur na čerstvá média probíhá v laminární boxu s vysterilizovaným sklem, pracovními pomůckami a živným médiem. Při sterilizaci v autoklávu se volí teplota vzhledem k termostabilitě mikroorganismů a určitých složek živného média. Nedodržování aseptických podmínek může končit úhynem vypěstované kultury.

Kultury *in vitro* sice nejsou závislé na klimatických podmínkách jako polní rostliny, ale i tak u nich musíme udržovat potřebnou vlhkost, osvětlení. U suspenzních kultur je důležitý neustálý pohyb mechanicky rozmělněné kultury, který většinou zajišťuje třepačka<sup>2,42</sup>.

Explantátové kultury mají uplatnění zejména v získávání produktů, které se běžně tvoří v polních kulturách. Dalším využitím může být ovlivnění produkce látek, které se nedají pěstovat vůbec nebo jen v malém množství. Změnou metabolismu v kulturách *in vitro* je možné dosáhnout zvýšené sekrece běžně dostupných metabolitů a tvorby metabolitu, který kultura odolávající přirozeným podmínkám není schopná vyprodukovat<sup>42</sup>.

### 4.2.3 Druhy explantátových kultur

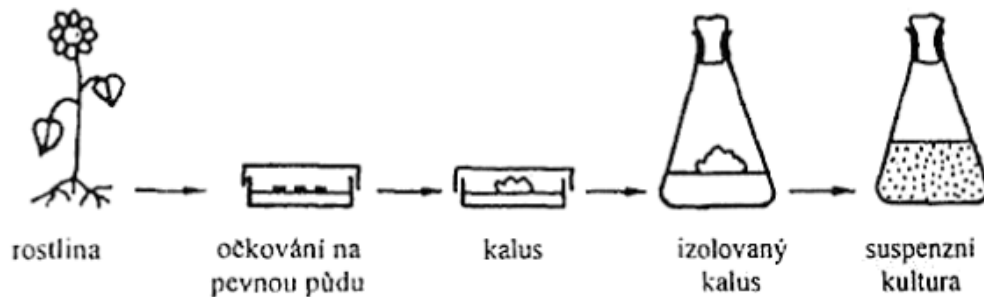
Podle vnější stavby rostliny můžeme rozlišovat kultury tkáňové, suspenzní kultury, orgánové kultury, buněčné kultury a kultury protoplastů.

#### **Kultury orgánové**

Podmínky pěstování orgánových systémů, jejich orgánů nebo jednotlivých částí *in vitro* zabezpečují, aby jejich stavba a funkce nebyly narušeny a zároveň zajistily jejich diferenciaci<sup>47</sup>.

#### **Kalusové kultury**

Kalus se skládá z hmoty, která je tvořena málo organizovanými, parenchymatickými buňkami. Tvorba kalusu může být iniciována jako ochranná odpověď na mechanické poškození stonků nebo kořenů. V kultuře je kalus aktivován pomocí hormonů a růstových regulátorů stimulačních růst buněk, obsažených v určité koncentraci v živném médiu<sup>45</sup>. Tvorba kalusu v daném kultivačním médiu trvá v rozmezí 2-6 týdnů. Pomocí pinzety nebo jiného pomocného aparátu se odebere část a přenesení se na nové kultivační médium, tento proces označujeme jako pasážování. Kultivace tkáňových kultur probíhá na polotuhých nebo tuhých kultivačních médiích. Periodickým přenášením kalusů na čerstvá kultivační média stoupá riziko genetických změn, ale na druhou stranu dochází ke ztrátě morfogenních vlastností. Mechanickým zpracováním kalusové kultury lze vytvořit suspenzní kulturu<sup>2</sup>.



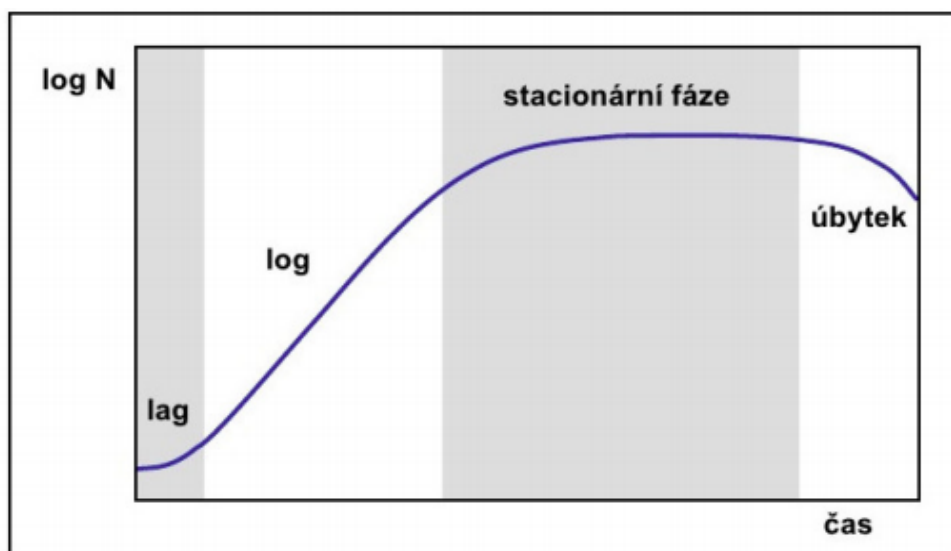
**Obrázek 7. Odvození explantátových kultur<sup>42</sup>**

### Suspenní kultura

Obsahují jednotlivá seskupení buněk, která vznikla mechanickým rozmělněním kalusové kultury a přenesením do tekutého živného média. Suspenní kultura jsou umístěné na zařízení (např. třepačka), které umožňuje pohyb média. Tekutost a pohyb média usnadňují výměnu plynů a efektivnější výživu buněk, proto také kultivace a růst suspenní kultury trvá kratší dobu než kalusové kultury<sup>2</sup>.

K popisu růstu explantátové kultury slouží tzv. růstová křivka, která zobrazuje závislost jednotlivých charakteristik kultury (množství buněk, hmotnost, atd.) na čase. Pomocí grafického znázornění můžeme znázornit jednotlivé růstové fáze, kterých máme celkem šest.

1. Lag fáze- úsek, kdy si buňky po přenesení do živného média zvykají na nové prostředí. Jejich koncentrace zůstává v rovnováze nebo se po určité době snižuje.
2. Fáze zrychlení- je doprovázena zvýšenou rychlostí rozmnožování buněk.
3. Fáze exponenciální- množení buněk probíhá maximální konstantní rychlostí, chemické složení buňky je stálé.
4. Fáze deklinační- z důvodu nedostatečného zabezpečení živin a tvorby toxických produktů metabolismu se výrazně snížila rychlost růstu buněk.
5. Fáze stacionární- mezi poklesem a růstem buněk se ustanovila rovnováha.
6. Fáze odumírání- došlo k porušení rovnováhy mezi buňkami a převýšení rychlosti odumírání<sup>42</sup>.



**Obrázek 8. Růstová křivka explantátových kultur<sup>46</sup>**

Pro kultivaci je nejvhodnější homogenní suspenzní kultura, která se však dlouhodobým pasážováním a vlivem genetických změn mění na heterogenní<sup>2</sup>.

#### **Buněčné kultury**

Kultury, jejichž kultivace probíhá v tekutých nebo polotuhých médiích, je tvořena jednotlivými, volnými snadno identifikovatelnými buňkami<sup>42</sup>.

#### **Kultury protoplastů**

Vznikají z buněčných kultur, kterým byla enzymaticky nebo mechanicky odstraněna buněčná stěna a obsah je tedy obalen pouze elastickou plasmonelou. Při enzymatickém odstranění buněčné stěny jsou rostlinné buňky umístěny do roztoku složeného z enzymů a osmoticky aktivních látek, které snižují osmotický a zamezují prasknutí buňky<sup>2,42</sup>.

### **4.3 Faktory ovlivňující růst in vitro**

#### **4.3.1 Živná média**

Různé rostliny a tkáně z různých částí rostlin mají odlišné výživové požadavky pro co nejuspěšnější růst. Proto je potřeba vybrat taková živná média, která tyto nároky splňují a jsou schopna zajistit optimální růst. Mezi nejčastější živná média patří médium Murashige a Skoog (MS), médium Linsmaier a Skoog (LS), médium Gamborg (B5) a médium Nitsch a Nitsch (NN).

Mezi nezbytné složky kultivačních médií patří mikroelementy a makroelementy, dále mezi prospěšné až nezbytné patří vitamíny, aminokyseliny, cukry, pufrы, růstové regulátory a zpevňující složky<sup>47</sup>.

## **Makroelementy**

Pro dobrou kultivaci je nezbytná přítomnost šesti prvků- dusík, vápník, hořčík, draslík, fosfor a síra. Pro zajištění nejvyšší růstové rychlosti je potřeba stanovit ideální koncentraci, která se liší podle charakteru dané rostliny. Dusík má nezastupitelnou úlohu v existenci rostlin. Jeho koncentrace v živném médiu by se měla pohybovat v rozmezí 25-60 mM anorganického dusíku. Pro maximální růst buněk je nezbytné, aby byl dusík v živném médiu přítomen v nitrátové formě nebo nejlépe v kombinaci s amonnými solemi v koncentraci 2-20 mM. Nezbytná je také přítomnost draslíku v ideální koncentraci 20-30 mM<sup>2,47</sup>.

## **Mikroelementy**

Železo, mangan, zinek, bor, měď, molybden patří mezi nejdůležitější prvky pro výživu buněčných kultur. Železo podávané ve formě citrátové nebo tartarátové soli způsobuje problémy z důvodu špatné rozpustnosti a možnosti vysrážení se při tvorbě média. Tento problém byl vyřešen pomocí chelatace s kyselinou ethylendiamintetraoctovou. Chlor a sodík jsou také součástí živných médií i přes přímé důkazy, které dokazují téměř nulový vliv na růst buněk<sup>2,47</sup>.

## **Zdroj uhlíku a energie**

Sacharóza používaná v koncentraci 2-5% není jediný zdroj uhlíku a energie, lze ji nahradit laktózou, galaktózou, maltózou nebo škrobem, jediným nedostatkem je, že byly vyhodnoceny jako méně účinné ve srovnání se sacharózou. Pomocí autoklávu se sacharóza hydrolyzuje na účinnější produkty, je tedy více vhodná pro kultivaci, a proto jí dáváme přednost před sacharózou sterilizovanou pomocí filtrů<sup>47</sup>.

## **Vitamíny a myo- inositol**

Množství vitamínu produkované explantátovými kulturami není většinou dostačující, proto je potřeba dodat vitamíny exogenním způsobem. Vitamíny se využívají hlavně jako katalyzátory mnoha metabolických procesů, ale nutné jsou pro výborný růst a vývoj rostlin. Nepostradatelnou součástí médií pro růst buněk je thiamin, přidáván většinou v koncentraci 0,1-10 mg/l. Některé vitamíny jako kyselina nikotinová, riboflavin, kyselina panthothenová, tokoferol, pyridoxin, biotin, kyselina listová a kyselina askorbová jsou přidávány i navzdory zanedbatelnému vlivu na růst buněk.

Myo- inositol je přidáván v malých množstvích v rozmezí 50- 5000 mg/l do kultivačních médií ke stimulaci růstu buněk. Důležitou roli hraje také při buněčném dělení, kdy dochází k jeho rozkladu na kyselinu askorbovou a pektin<sup>47</sup>.

## **Aminokyseliny**

Syntéza aminokyselin pro správný růst kultur probíhá přímo v rostlinách. Pro vytvoření kultur buněk a protoplastů je důležité dodat aspoň malé množství aminokyselin, které můžou být dodávány jednotlivě nebo v jejich směsích. Aminokyseliny jsou buněčným kulturám dodávány hlavně jako dobrý zdroj dusíku, které jsou přijímány rostlinou rychleji než anorganický dusík. Pro zvýšení buněčného růstu je používán cystein, glutamin, asparagin, L- arginin, L-

tyrosin, glycin. K dodání organického dusíku do kultivačních médií se nejčastěji dodává směs aminokyselin v podobě hydrolyzátu kaseinu v koncentraci 0,25- 1 g/l<sup>47</sup>.

### **Nedefinované organické zdroje**

Pro zvýšení růstu se do kultivačních médií přidávají látky získané z přírodních zdrojů nebo extrakty. Za zmínku stojí např. kokosové mléko, sladový extrakt, banánový extrakt, bílkovinné hydrolyzáty. Dodáním aktivního uhlí může být pozorován pozitivní nebo negativní účinek. U orchideje, cibule a mrkve došlo po přidání aktivního uhlí k stimulaci růstu, naproti tomu u sóji mělo aktivní uhlí opačný účinek. Příčinou zvýšené hydrolýzy sacharózy při autoklávování, která má za následek okyselení živného média, je přítomnost 1% aktivního uhlí<sup>47</sup>.

### **Látky zpevňující médium**

Pro optimální růst pěstovaných kultur je potřeba dostatečná pevnost kultivačního média. Mezi často využívané želírující látky pro přípravu tuhých a polotuhých rostlinných tkáňových médií patří agar, agaróza a gellanová guma. Agar má vůči ostatním činidlům vyšší cenu, ale také má mnoho výhod. Agarový gel je snadno mísitelný s vodou, tvoří gel v teplotním rozmezí 60- 100 ° C, tuhne při 45 ° C a je stabilní při všech kultivačních teplotách. Agar je velmi odolný vůči působení enzymů a nedochází tak k jeho štěpení. V kultivačních médiích je obvykle přítomen v koncentraci 0,8- 1,0%. Agar bývá často nahrazen bramborovým škrobem, rýžovým práškem nebo jejich kombinací, které mají stejný účinek jako agar, ale jejich použitím dochází ke snížení nákladů na tvorbu gelu<sup>47</sup>.

#### **4.3.1.1 Růstové regulátory**

Sloučeniny, které v malé koncentraci (1mmol/1,1μmol/l) při transportu do buňky a ovlivnění genové aktivity v jádře pomocí receptorového systému v plasmatické membráně a s nimi spojenými signálními drahami mohou vyvolat fyziologickou, metabolickou nebo morfologickou reakci v místě vzniku nebo v místech, do kterých je transportován. Růstové regulátory mají rozdílnou chemickou strukturu, funkci, účinek a podle těchto charakteristik rozeznáváme auxiny, cytokininy, gibereliny, etylén, kyselinu abscisovou, kyselinu jasmonovou<sup>44</sup>. Růstové regulátory se projevují větší mírou různých účinků, které závisí na druhu růstové látky a její koncentraci, tak fyziologickým stavem orgánu nebo buňky, na kterou daný regulátor působí<sup>49</sup>.

### **Auxiny**

Chemicky označovány za deriváty indolu. Mezi nejběžněji používané v kultivačních médiích patří kyselina-3- indolactová, kyselina 2,4- dychlorfenoxyoctová a kyselina naftalen-octová. Mezi jediný přírodní auxin existující v rostlinných tkáních patří kyselina-3- indolactová. Působení auxinů může být mnohostranné, ovlivňují stimulaci růstu buněk, rychlost dělení, dělení kambiálních buněk, stimulaci růstu kořenů, zacelování ran při poranění, apikální dominanci, vznik partenokarpických plodů a tvorbu semen. Ve vyšších koncentracích mohou působit toxicky<sup>47,48</sup>.

## Gibereliny

Odvozeny z diterpenů, syntéza probíhá v mladých listech, klíčících semenech, kořenech a mladých plodech. Působí na stimulaci růstu, klíčení semen, stimulaci dělení buněk, plasticitu buněčné stěny, zvýšení osmotického tlaku, zvětšení orgánů a mění fotoperiodickou adaptaci rostlin. Na rozdíl od auxinů nepůsobí ve vyšších koncentracích toxicky<sup>48</sup>.

## Cytokininy

Cytokininy jsou deriváty adeninu, mezi přirozené patří zeatin, adenin, mezi umělé benzyladenin, kinetin, topolin, thidiazuron. Tvorba probíhá v kořenových špičkách, kořenech a nadzemních částech (mladé listy, nezralá semena), poté jsou přepraveny do prýtu. Působení cytokininů má vliv na regulaci buněčného cyklu, stimulaci proliferace buněk v tkáňových kulturách, stimulaci růstu prýtu, inhibici růstu kořenů, oddálení senescence, potlačení apikální dominance. Bohužel může mít přítomnost nadměrného množství cytokininů neblahé účinky na rostliny a to v podobě tvorby nádorů<sup>49</sup>.

## Kyselina abscisová

Její syntéza probíhá ve stárnoucích listech z kyseliny mevalonové. Zpomaluje růstové procesy a růst embrya, brzdí prodlužovací fázi, navozuje dormanci pupenů a semen, podporuje odpad listů a plodů, brzdí klíčení, ovlivňuje zavírání průduchů, inhibuje syntézu proteinů a brzdí metabolickou aktivitu.

## Ethylén

Ethylén je tvořen ve všech částech rostlin, hlavně u dozrávajících plodů. Svým působením může brzdit růst buněk, zpomalit dlouhivý růst stonků a kořenů a tím stimulovat růst květů a plodů, urychluje opad listů a plodů, stimulovat dozrávání plodů a klíčení semen, stimulovat rašení pupenů a v konečném případě může degradovat chlorofyl a stimulovat biosyntézu karotenoidů<sup>49</sup>.

Auxiny, gibereliny, cytokininy, kyselina abscisová a ethylén patří mezi základní, nejčastěji používané růstové regulátory. Existují i jiné látky s růstově regulačním působením, mezi které patří:

- Kyselina jasmonová, jejíž vliv má dopad na předčasné stárnutí listů, brzdí růst kalusů a může inhibovat růst hypokotylů a listových pochev.
- Brassinosteroidy, díky kterým může dojít k zesílení odolnosti vůči stresovým situacím (sucho, teplo), ale i k podpoře dlouhivého růstu.
- Fenolické látky, které mohou napomáhat při infekci *Agrobacterium tumefaciens*.
- Polyaminy mohou podporovat růst *in vitro* a somatickou embryogenezi, ovlivňovat buněčný cyklus a zvýšit ochranu rostlin vůči stresovým situacím, pomocí stabilizace membrán.
- Oligosacharidy zvyšují ochranu v případě napadení patogenem<sup>48</sup>.

### 4.3.2 Fyzikální podmínky kultivace

Kromě dostatečného přísunu živin z kultivačních médií a dodržování aseptických podmínek jsou stejně důležité i fyzikální podmínky. Velkou roli hraje zejména teplota, fotoperioda, konstantní vlhkost, acidobazické vlastnosti kultivačního média, zabezpečení nepřetržitého míchání vyžadující hlavně suspenzní kultury<sup>2,44</sup>.

#### Světelný režim

Termín osvětlení nezahrnuje pouze délku působení světla v průběhu jednoho dne, ale i intenzitu a výběr vhodného spektra vzhledem k pěstované kultuře<sup>50</sup>. Murashige tvrdí, že při dodržení desetihodinového osvětlení během 24 hodin dojde ke správnému růstu kultury a zabránění odumírání jejich jednotlivých částí. Nastavení intenzity světla dochází v souladu s vývojovým stádiem kultury. Příčinou nízké tvorby orgánů je většinou nedostatečná intenzita osvětlení. Daleko horší situace nastávají při přítomnosti nadměrné intenzity, kdy je často vývoj orgánů úplně zastaven<sup>51</sup>. Světlo může vystupovat jako aktivátor metabolických pochodů a iniciovat tak produkci sekundárních metabolitů u určitých tkáňových kultur, příkladem jsou například kultury mrkve a petržele<sup>52</sup>.

#### Teplota

Ideální rozmezí teplot pro správný růst a následnou produkci sekundárních metabolitů je mezi 20 a 25 °C. K poruchám metabolismu a zástavě tvorbě buněk dochází vlivem nízkých teplot. K nevratnému poničení kultury dochází v důsledku zvýšené teploty<sup>51,52</sup>. Důvodem udržování nižších teplot při vytváření nové kultury je menší pravděpodobnost vzniku a přenosu nákazy a prodloužení existence explantátů<sup>52</sup>.

#### Acidita prostředí

Kultivace probíhá ve většině případů v mírně kyselém prostředí, které bývá v rozmezí 5,4-5,7. Acidita je důležitá zejména pro správný metabolismus jednotlivých složek, které jsou přítomné během kultivace *in vitro*, jako jsou vitamíny, regulátory růstu a aminokyseliny. Jak už bylo výše zmíněno, acidita není podmínkou, určitým druhům rostlin vyhovuje spíše zásaditější prostředí s pH mezi 6,0-7,0. Acidobazické vlastnosti v živném médiu lze regulovat přidáním hydroxidu draselného pro mírné zvýšení bazicity nebo kyseliny chlorovodíkové při nedostatečné kyselosti média<sup>2,51</sup>.

#### Vlhkost vzduchu

Každá kultura má specifické požadavky na vlhkost vzduchu, proto je uváděno poměrně široké rozmezí mezi 20-98 %<sup>2</sup>.

## 4.4 Fyziologie stresu u rostlin

### 4.4.1 Stresové reakce a stresové faktory

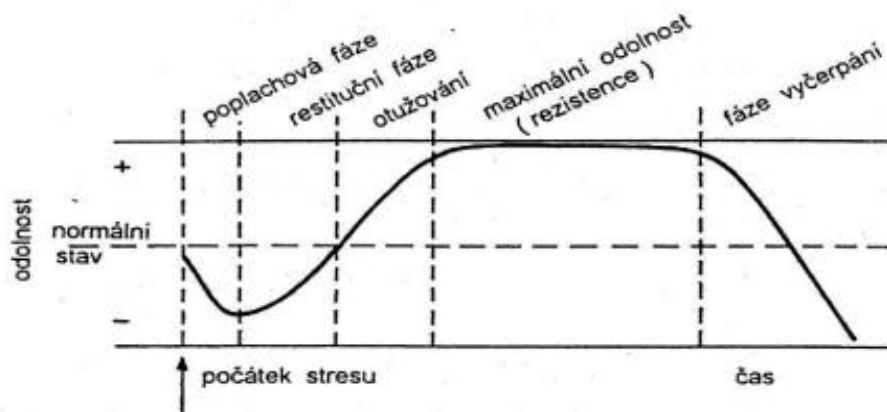
Rostliny jako přisedlé organismy jsou během svého života ovlivňovány řadou nepříznivých a proměnlivých faktorů životního prostředí. Tyto nepříznivé podmínky (stresové faktory) sice působí na určitou část, ale trpí rostlina jako celek. Zpomalují růst a omezují produktivitu rostlin, ovlivňují jednotlivé funkce orgánů, dokonce u zvláště citlivých druhů může vlivem stresové reakce dojít k vážnému poškození rostliny a někdy dokonce až k jejímu úhynu. Během stresových reakcí je energie soustředěna do obranných mechanismů a jen malá část je využita k podpoře růstu<sup>53</sup>.

Živočichové mají na rozdíl od rostlin jednu velkou výhodu, kterou je možnost úniku nebo bezpečné vzdálení od stresového faktoru. Rostlinné organismy jsou proto vybavené aktivními nebo pasivními ochrannými mechanismy, které dokáží čelit nepříznivým podmínkám<sup>53</sup>.

- **Pasivní ochrana**- působí jako dlouhodobá ochrana před stresory, vytvořením pevné bariéry, která zamezuje průniku do vnitřního prostředí rostliny. Docílit této ochrany lze například zesílením kutikuly a tvorbou trichomů na listech, napuštěním buněčných stěn vhodnou kapalinou a zajištěním tak její nepropustnosti, rezervoáry vody<sup>53</sup>.
- **Aktivní ochrana**- zmírňuje škodlivý dopad stresových faktorů po proniknutí do buněk nebo tkání. Stresor má schopnost proniknout přes bariéru a vyvolat sled změn nazývané jako stresová reakce<sup>53</sup>.

Průběh stresové reakce lze popsat obecným schématem a rozdělit do několika fází<sup>53</sup>:

- **Poplachová fáze**- při prvním kontaktu stresoru s rostlinou nebo organismem dojde k stimulaci obranných mechanismů a prvotnímu poškození buněčných struktur a funkcí.
- **Resuscitační fáze**- pokud stresový faktor nepůsobí letálně, ale jeho přítomnost nadále přetrvává, dojde k indukci kompenzačních mechanismů.
- **Rezistenční fáze**- kompenzační mechanismy jsou schopné zvýšit odolnost natolik aby rostlina byla schopná čelit stresovým podmínkám po delší dobu.
- **Fáze vyčerpání**- žádná rostlina není schopna vydržet dlouhodobé působení stresorů a po určité době dojde k jejímu vyčerpání a snížení odolnosti.



**Obrázek 9. Idealizovaný průběh stresové reakce<sup>53</sup>**

Vývoj a celkový výsledek stresové reakce závisí na jednotlivých faktorech, mezi které patří délka setrvání stresoru a jeho intenzita. Důležitá je zde i schopnost organismu se adaptovat. Změnou určitého faktoru prostředí dochází ke zvýšené odolnosti rostliny proti působení stresoru, nazýváme ho jako aklimace. Pro produkci konkrétních metabolitů a ustálení vnitřního prostředí po dlouhodobém vystavení rostliny stresovým podmínkám je potřeba dodatečného dodání energie.

Velmi častým případem je působení více stresových faktorů najednou (extrémní teploty, nedostatek iontů a solí, nedostatek kyslíku). Díky tomu může dojít k vzájemnému ovlivňování a celkové změně stresové reakce, na rozdíl od působení jednotlivých faktorů zvlášť<sup>53</sup>.

#### **4.4.2 Společné mechanismy stresových reakcí**

Vysoká variabilita stresorů a neustále měnící se biochemické podmínky v buňkách velice komplikují hledání společných mechanismů stresových reakcí. I přesto je známo několik společných opakujících se procesů. Mezi jedny z nejvýznamnějších patří syntéza proteinů, do kterých spadá i tvorba stresových fytohormonů (polyaminů, kyseliny jasmonové, metyljasmonátů a kyseliny abscisové) a syntéza konkrétních stresových proteinů, které mají ochranný charakter. Za zmínku stojí i tvorba cukrů a polyalkoholů označované jako osmoregulační sloučeniny nebo tvorba a odstraňování kyslíkových radikálů.

##### **Stresové proteiny**

Během krátké doby dochází k závažným změnám v buňkách, které způsobují změny hladin jednotlivých proteinů. Nemusí docházet pouze k jejich zvýšení, u některých druhů můžeme naopak pozorovat stupeň snížení.

Ubikvitin, molekulární chaperony a proteázy mají schopnost stimulovat tvorbu proteinů, které se nedají běžnými technikami za normálních podmínek zjistit. Příčinou jejich nadměrné produkce je ničení proteinů za stresových podmínek, které jsou součástí odlišných struktur buněk. Proteiny dělíme na tři skupiny a tvoří základní výbavu všech genotypů.

Funkce chaperonů spočívá ve změně konformace při membránovém transportu a to i u nepatrně poničených proteinů. Ubikvitin slouží k označování proteinů a následnému štěpení

prostřednictvím proteáz na aminokyseliny, které jsou následně použity k tvorbě nových proteinů. Tento osud čeká pouze proteiny, u nichž náprava jednotlivých změn není možná<sup>53</sup>.

Mezi nejvýznamnější druhy stresových proteinů patří<sup>53</sup>:

- Proteiny stimulované teplem
- Proteiny stimulované sníženou teplotou
- Proteiny stimulované ztrátou vody
- Proteiny stimulované nedostatkem kyslíku
- Proteiny stimulované napadením různými patogeny

### **Stresové fytohormony**

Kyselina abscisová je významná hlavně kvůli svým dobrým obranným mechanismům a schopností adaptace k rostlinám. Mezi její základní účinky patří zpomalení prodlužovacího růstu, předčasné stárnutí, usměrnění dormance a urychlení opadu. Nejdůležitější funkce spočívá v ochraně rostliny při zvýšené ztrátě vody a ve snížení škodlivého vlivu některých stresových faktorů způsobující nedostatečnou vlhkost. Při nebezpečí z nedostatečného příjmu vody reaguje rostlina uzavřením průduch.

Ethylen, díky své existenci v plynné formě umožňuje schopnost pronikat do mezibuněčných prostor a do ovzduší skrz průduchy. Mezi jeho fyziologické účinky patří podpora radiálního růstu a zrání plodů, naopak zpomaluje prodlužovací růst a svoji roli má i v apikální dominanci. Produkce ethylenu funguje jako prvotní odezva při napadení rostliny stresovými faktory, kterými jsou střídání nízkých a vysokých teplot, poškození patogenní mikroorganismy, nadbytek iontů solí, nadměrné množství nebo nedostatek vody, přítomnost toxických kovů a plynů v půdě. Vyšší přítomnost ethylenu je spojována s produkcí fytoalexinů, které se pomocí aktivovaných enzymů podílí na obranných mechanismech rostlin a zamezují enzymům rozkládat určitá pletiva, díky jejich zvýšené odolnosti.

Kyselina jasmonová a methyljasmonát patří mezi inhibitory a způsobují předčasné stárnutí jednotlivých částí listů. Mají důležitou roli jako přenašeči signálu při poškození, přítomnosti elicitorů nebo patogenních mikroorganismů.

Polyaminy slouží k podpoře a urychlení růstu v místech nepřetržitého buněčného dělení, které se odehrává především v *in vitro* systémech. Schopnost reagovat s DNA umožňuje změnu její konformace a s tím spojenou genovou expresi. Další výhodou snadné reakce je schopnost DNA odolávat denaturaci. Tvorba ideálního pH patří mezi další funkce polyaminů. Výše zmíněné účinky pomáhají rostlinám odolávat stresovým situacím<sup>53</sup>.

### **Aktivní formy kyslíku**

V dřívějších letech byly reaktivní formy kyslíku (ROS) sledovány pro své toxické účinky, které vznikaly jako produkty aerobního metabolismu. Dnes už víme, že jako druzí poslové se využívají při přenosu signálu. Regulují růst a vývoj rostliny a řídí reakce rostlin na biotické a

abiotické elicitory. Tvorba reaktivních forem kyslíku a rychlost jejich odstranění musí být v rovnováze. Zvýšené množství ROS vzniká jako důsledek narušené rovnováhy a způsobuje tak závažné poškození buněk. Peroxizomy, chloroplast a mitochondrie jsou primárním místem pro tvorbu reaktivních forem kyslíku, buněčná stěna a membrána, endoplazmatické retikulum se využívají až jako sekundární místo<sup>54</sup>.

V chloroplastech fotoredukci kyslíku vzniká superoxidový radikál, který je základním produktem Mehlerovy reakce probíhající ve fotosystému I. Superoxidový radikál není konečným produktem, umožňuje vznik hydroxylových radikálů a peroxidu vodíku. Ve fotosystému II dochází rozkladem vody k soustředění zvýšené koncentrace kyslíku. Při absorpci záření dochází v chloroplastech ke vzniku velkého množství energie. Možnost vzniku singletového kyslíku v chloroplastech je podmíněno přenosem excitační energie mezi chlorofylem a kyslíkem a intenzivním zářením.

V mitochondriích dochází autooxidací ubichinonu ke vzniku reaktivních forem kyslíku jako je superoxid a později i peroxidu vodíku<sup>53</sup>.

Koncentrace reaktivních forem kyslíku je za běžných okolností nízká (240 μmol s<sup>-1</sup>), působení stresových faktorů umožňuje až trojnásobné navýšení koncentrace ROS.

U membránových lipidů uložených v nitrobuněčných organelách nebo v plazmalemě dochází k silnému poškození při interakci peroxidů s nenasycenými mastnými kyselinami. Dalším negativním vlivem ROS je ztráta funkce DNA nebo RNA, která může způsobit až zánik jednotlivých buněk. ROS také způsobují oxidaci proteinů a potlačují aktivitu enzymů.

Tvorba superoxidovaného radikálu může probíhat i za pomoci enzymů. Mezi nejvýznamnější enzymy, které jsou schopny tvorby reaktivních forem kyslíku patří tryptofandioxygenáza, dihydroorotátdehydrogenáza a xanthinoxidáza. Xanthinoxidáza umožňuje oxidaci xanthinu, který působí hlavně jako donor elektronů, ale jeho přeměnou na kyselinu močovou dochází ke vzniku superoxidovaného radikálu, který je pouze meziproduktem a jeho redukcí vzniká hydroxylový radikál a peroxid vodíku. Obdobným mechanismem působí i aldehydoxidáza s využitím aldehydu jako donoru elektronů. Zdrojem ROS mohou být také enzymy, které tvoří rovnou konečné produkty bez vzniku superoxidu patří mezi ně glukosaoxidáza, prostaglandinsyntháza a guanylátcykláza.

Přítomnost ochranného systému před oxidací nalezneme ve vícebuněčných strukturách. Dělíme je na enzymové nebo neenzymové a běžné (např. α-tokoferoly, β-karoten, redukovaný glutathion) nebo specializované (peroxidáza, kataláza)<sup>51</sup>. Důležitou úlohu v obraně před ROS hrají zejména flavonoidy, které mají schopnost regenerovat radikály poškozenou membránu chloroplastů<sup>54</sup>.

Reaktivní formy kyslíku chrání rostlinu při vyvolání stresové reakce patogenními mikroorganismy. Pevně vázané proteiny v buněčné stěně se díky peroxidu vodíku stávají téměř nerozpustnými, dochází k celkovému zpevnění buněčné stěny a zvýšené odolnosti při působení stresorů<sup>53</sup>.

## 4.5 Elicitace

Děj, kdy přidáním stopového množství elicitoru do tkáňových kultur indukujeme nebo zvýšíme produkci sekundárních metabolitů, jejich produkce nebývá často vysoká a velice záleží na jejich fyziologickém stavu a vývojové fázi rostliny<sup>1</sup>.

### 4.5.1 Elicitory

Definujeme jako látky, které zvyšují produkci sekundárních metabolitů při aplikaci jejich stopového množství ke kulturám *in vitro*. Dělit je můžeme na základě původu na endogenní a exogenní nebo podle povahy na biotické a abiotické<sup>1,55</sup>.

dělení podle povahy<sup>1</sup>:

#### 4.5.1.1 Abiotické elicitory<sup>55</sup>

Abiotické elicitory jsou látky, které na základě jejich vlastností dělíme na fyzikální, chemické a hormonální.

##### Fyzikální elicitory:

Světlo je významný stimulantem při zvyšování produkce sekundárních metabolitů. Jeho působením došlo například ke zvýšení koncentrace zingiberenu a gingerolu v kalusové kultuře *Zingiber officinale*. Nejen světlo, ale i UV záření má vliv na tvorbu obsahových látek. Významným zjištěním byla vysoká koncentrace vinkristinu a vinblastinu v rostlinách *Catharanthus roseus* po působení UV záření, které mají vysoký potenciál v léčbě leukémie a lymfomu.

Osmotický neboli vodní stres neovlivňuje pouze produkci v explantátových kulturách, ale i fyziologické a biochemické vlastnosti rostlin. K vyvolání osmotického stresu je zapotřebí látek nazývaných jako osmolyty. Patří sem prolin, polyethylenglykol a sacharóza. Prolin má kromě osmotických vlastností také ochrannou funkci pro enzymy přítomné v cytoplasmě a funguje jako zásobník dusíku a uhlíku pro růst po stresové reakci. Ukázalo se, že vlivem osmotického stresu došlo u *Hypericum perforatum* ke zvýšení syntézy hyperforinu a naopak ke snížení koncentrace hypericinu a pseudohypericinu.

Vlivem slanosti může dojít ke snížení růstu rostlin, ale také ke zvýšení produkce obsahových látek zejména fenolu, terpenů a alkaloidů. Pomocí elicitorů NaCl byla zjištěna zvýšená koncentrace vinkristinu a vinblastinu v kultuře *C. roseus* naopak u kultur citlivějších na přítomnost soli došlo ke snížení syntézy sekundárních metabolitů.

Zvýšená produkce sekundárních metabolitů za sucha je vyvolaná pomocí světelného záření a vysokých teplot. Příkladem je zvýšená koncentrace saikosaponinů v *Bupleurum chinense*, které se uplatňují v léčbě zánětu.

Zvýšená i snížená teplota může ovlivnit produkci obsahových látek rostlin. Střídavé snižování a zvyšování teplot pozitivně ovlivňuje metabolismus, permeabilitu a rychlost reakcí

v buněčných kulturách rostlin. Pro dobrý růst tkáňových kultur se běžně využívá teplota v rozmezí 17- 25 °C. Studie dokazují, že zvýšením teploty nad 35 °C po dobu delší než 15 dnů došlo ke zvýšení obsahových látek hypericinu a hyperforinu u třezalky tečkované.

#### **Chemické elicitory:**

Nikl, stříbro, železo a kobalt jsou nejčastěji využívané **těžké kovy** k ovlivnění produkce sekundárních metabolitů. Dobrým abiotickým elicitorem může být také měď, která společně s kadmíem zvyšuje produkci shikoninu a digitalinu. Ošetřením kultury *Beta vulgaris* měďnatými ionty byla pozorována zvýšená akumulace betalainů. V mnohých případech může měď poskytovat lepší výtěžek než jiné kovy, příkladem je zvýšená koncentrace lepidinu v kulturách *Lepidium sativum*. Změnou metabolismu rostlin pomocí těžkých kovů dochází ke zvýšené syntéze cukrů, bílkovin, fotosyntetických pigmentů a neproteinových thiolů.

#### **Hormonální elicitory:**

**Kyselina jasmonová** a její deriváty patří mezi cyklopentanové sloučeniny. Jasmonáty ovlivňují syntézu metabolitů v situaci, kdy rostlina musí čelit stresovým situacím, například v případě napadení patogeny. Jasmonáty jako abiotické elicitory mohou významně ovlivnit výtěžek kyseliny rosmarinové v *Mentha piperita*, plumbaginu v kořenech *Plumbago indica* a antokyaninu ve *Vitis vinifera*.

**Kyselina salicylová** patří mezi další důležité hormonální elicitory. Její předností je vysoká rezistence na škodlivé patogeny. Jako abiotický elicitor ovlivnila produkci alkaloidů vinkristinu a vinblastinu, tropanového alkaloidu skopolaminu, stilbenu nebo pilokarpinu.

#### **4.5.1.2 Biotické elicitory**

- mikroorganismy volné a rozpoznané rostlinnou buňkou (enzymy, fragmenty buněčné stěny)
- mikroorganismy působící na buněčné stěny (pektiny)
- rostlinné enzymy působící na buněčné stěny mikrobů (chitosan, glukan)

Chitin, chitosan, agropektin jsou polysacharidy používané v kulturách *in vitro* jako elicitory přírodního původu. Použitím chitinu v suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* dojde ke zvýšené sekreci fenylpropanoidů a naftodiantronů<sup>55</sup>.

dělení podle **původu**<sup>1</sup>:

##### **1 Exogenní**

- polysacharidy (glukany, chitosan)
- polyaminy
- mastné kyseliny (kyselina arachidonová a eikosapentanová)
- enzymy (polygalakturináza, celulóza)

## 2 Endogenní

- galaktouronid
- hepta -  $\beta$ - glykosidy

### 4.5.2 Mechanismy elicitace

I po zdoluhavém výzkumu vlivu abiotických a biotických faktorů na produkci sekundárních metabolitů není znám přesným mechanismus jejich působení<sup>1</sup>. Jednotlivé elicitory se mezi sebou vzájemně liší různými sledy událostí v závislosti na zdroji výživy, jejich původu, růstovém cyklu, koncentraci a fyziologickochemickém prostředí<sup>1</sup>.

Existuje však řada hypotéz<sup>1</sup>:

- elicitace vyvolaná vazbou na membránový receptor
- zvýšeným efluxem vápenatých iontů do intracelulárního prostoru
- změnou fosforylace proteinů a aktivace proteinkinázy
- iniciace G- proteinu pomocí mitogenem stimulované proteinkinázy
- snížení pH cytoplasmy pomocí inhibice H<sup>+</sup>- ATPasy
- akumulací proteinů související s patogenezí jako jsou chinikázy a glukánázy, které přispívají k uvolňování signálních pektických oligomerů

### 4.5.3 Faktory ovlivňující elicitaci

#### Specifita elicitoru

Řádně provedené studie prokázaly, že produkci sekundárních metabolitů u rozdílných explantátových kultur lze zvýšit jedním typem elicitorů, ale naproti tomu je dokázáno, že syntéza jedné kultury může být ovlivněna rozmanitými druhy elicitorů. Z toho faktu je zřejmé, že syntéza sekundárních metabolitů dané explantátové kultury není vázána na druh elicitoru<sup>56</sup>.

#### Koncentrace a doba expozice elicitoru

Doba působení elicitoru na danou kulturu a koncentrace elicitoru jsou parametry, které se stanovují v závislosti na zkušenostech. Podle koncentrace se odhaduje účinná dávka a síla reakce. Vzhledem ke zkušenostem, že u jednoho rostlinného druhu po přidání určité koncentrace elicitoru se zvýšila sekrece sekundárních metabolitů a u jiného druhu nedošlo k žádnému ovlivnění produkce, je zřejmé, že koncentrace se liší v závislosti na druhu rostlin.

To samé platí i pro dobu působení elicitoru v daném systému, kdy čas pro získání co nejvyšší produkce sekundárních metabolitů se liší v závislosti na daném druhu rostliny a rychlosti metabolismu<sup>56</sup>.

## Podmínky pěstování explantátových kultur

Mezi důležité parametry pro efektivní růst kultur a navození správného sekundárního metabolismu patří složení živného média, světelné podmínky a znalost stádia růstu. Různé publikace uvádějí, že nejvyšší aktivita enzymů je během exponenciální fáze, proto je vhodné v této fázi přidat elicitor. Vzhledem ke složení živného média a jeho vlivu na průběh elicítace je důležitá přítomnost růstových regulátorů. Případem, kdy bez růstových regulátorů nedošlo k elicítaci jsou buněčné kultury mrkve. Nezanedbatelnou úlohu má i světlo. Známým příkladem je elicítace kultury *Hypericum perforatum* L., kdy byla zaznamenána vyšší sekrece hypericinu za tmy než za světla<sup>56</sup>.

## 4.6 Pyraziny

Pyraziny jsou aromatické látky, systematicky nazývané jako 1,4 diaziny. Jedná se o sloučeniny se symetrickou molekulou a planárním jádrem umožňující zobrazení pomocí rezonančních struktur. Vzhledem ke svým vlastnostem je řadíme mezi slabé báze, které díky kladným nábojům na atomech uhlíku pyrazinového heterocyklu podléhají snadněji nukleofilním substitucím. Velkým průlomem na přelomu 2. poloviny 20. století bylo zavedení nových analytických metod např. HPLC, které umožnily stanovit přítomnost nestabilních derivátů pyrazinu nacházejících se v nepatrných koncentracích ve zdrojích přírodního původu. Kromě objevu sloučenin přírodního původu byla zvýšena i tvorba syntetických derivátů<sup>57</sup>.

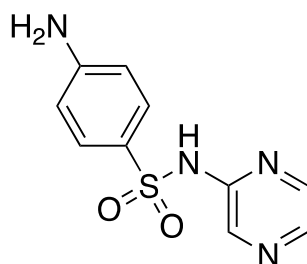
Rostliny a živočichové (např. hmyz) spolu v přírodě komunikují prostřednictvím určitých pachů vznikajících na základě vylučování látek nazývaných jako feromony, které jsou odvozeny od derivátů pyrazinu. Zejména alkylované a alkoxylované deriváty jsou využívány v přípravě pokrmů jako korigencia chuti a vůně, obsažené jsou i v červeném víně. Zodpovědnost mají i za vůni pražené kávy, která se ztrácí se změnou jejich složení. Z hlediska léčebného účinku jsou využívány jako antibiotika s baktericidními účinky získané izolací z *Aspergillus flavus* nebo jako antifungální léčiva, která jsou už dnes nahrazeny bezpečnějšími léčivy. Studována je i protinádorová aktivita u látek produkovaných rostlinami a živočichy žijících v moři<sup>57</sup>.

Vedle prospěšných vlastností mohou způsobovat přírodní deriváty i řadu nežádoucích účinků pomocí toxických radikálů. Reaktivní produkty vznikají hlavně ve směsích obsahující sacharidy, aminokyseliny nebo dusíkaté látky vlivem špatného skladování nebo zahřívání. Ochrana před nežádoucími vlivy spočívá v kontrole všech přísad hlavně sacharidů nebo přidáním antioxidantů.

Syntetické deriváty pyrazinu se hojně využívají v potravinářském průmyslu k vylepšení organoleptických vlastností pokrmů nebo jako přísady do tabáku či parfémů<sup>57</sup>.

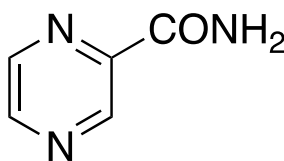
Známé jsou i pro své farmakologické účinky, kde léčiva obsahují ve své molekule pyrazinový kruh:

- Sulfoamidová chemoterapeutika mají ve své molekule pyrazinový heterocykl, který není zodpovědný za farmakologickou aktivitu, pouze ovlivňuje farmakokinetické vlastnosti např. **sulfapyrazin**.



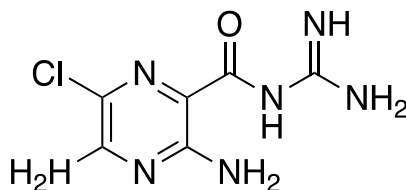
**Obrázek 10. Sulfapyrazin<sup>57</sup>**

- Antituberkulotika v podobě **pyrazinamidu**, kde je biologická aktivita závislá na přítomnosti pyrazinu.



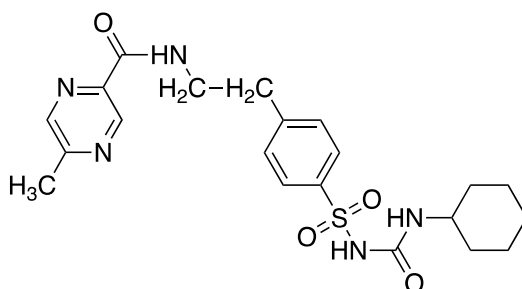
**Obrázek 11. Pyrazinamid<sup>57</sup>**

- **Amilorid**, který je pro své diuretické účinky využíván v léčbě hypertenze.



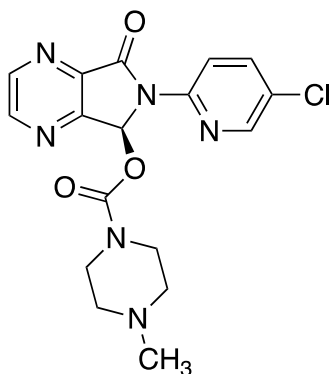
**Obrázek 12. Amilorid<sup>57</sup>**

- Perorální antidiabetikum **glipizid** slouží ke snížení hladiny cukru v krvi.



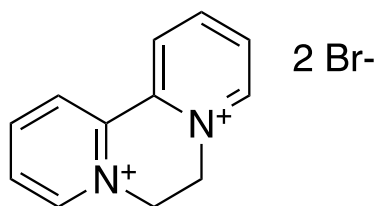
**Obrázek 13. Glipizid<sup>57</sup>**

- První nebenzodiazepinové hypnotikum **Zopiklon** dnes už se využívá jeho eutomer **Eszopiklon**.



**Obrázek 14. Eszopiklon<sup>57</sup>**

Syntetické deriváty se dají dále využít jako herbicidy. Nejúčinnějším zástupcem byl **diquat-dibromid**, který svou toxicitou způsoboval krvácení do mozku nebo akutní selhání ledvin. Proto je už dnes nahrazen bezpečnějšími herbicidy<sup>58</sup>.

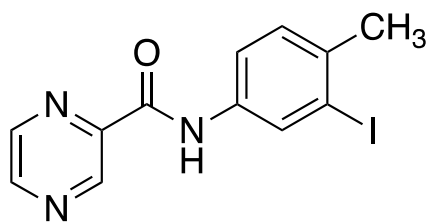


**Obrázek 15. Diquat-dibromid<sup>58</sup>**

#### **4.7 Pyrazinové deriváty jako abiotické elicitory**

Během zkoumání všech vlastností syntetických derivátů pyrazinu byl kromě farmakologických účinků zjištěn i vliv na zvýšenou tvorbu sekundárních metabolitů v explantátových kulturách. Schopnost elicitace byla prokázána zejména u derivátů kyseliny pyrazin-2-karboxylové konkrétně u látky 1-(2-chlorpyridin-4-yl)-3-fenylmočoviny, která urychluje rozmnožování a růst buněk. V některých státech byla schválena ke zvýšení produkce určitých druhů ovoce, např. v USA vinná réva a kiwi. Přidáním podobných látek z této skupiny ke kulturám *Fagopyrum esculentum* Moench s cílem zvýšit produkci rutinu, byly tyto deriváty na základě výsledků vyhodnoceny jako slibné elicitory<sup>59</sup>.

Rozsáhlé studie dokazují, že nově syntetizované deriváty pyrazin 2-karboxamidu zvyšují produkci flavonolignanů v kulturách *Sylibum marianum* a flavonoidů v kulturách *Ononis arvensis*<sup>60</sup>.



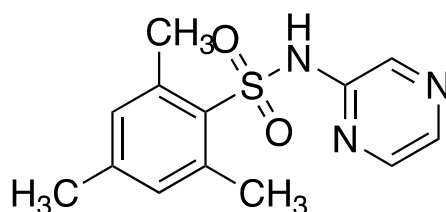
**Obrázek 16. Syntetický derivát pyrazin-2-karboxamid<sup>60</sup>**

#### 4.7.1 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid

Při provádění praktické části diplomové práce byl ke kalusovým a suspenzním kulturám třezalky tečkované přidáván elicitor pod zkratkou EM17, systematickým názvem 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid. Syntéza látky proběhla v srpnu roku 2018 pod vedením prof. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové, katedře farmaceutické chemie a analýzy. O dané sloučenině jsou známy prozatím tyto informace<sup>61</sup>:

**Tabulka 1. Fyzikálně-chemické vlastnosti 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid**

Molekulová hmotnost	277,34
Rozpustnost	Rozpustnost v horkém ethanolu Rozpustnost v dimethylsulfoxidu Nerozpustné v horké vodě
Teplota tání	200-201,9 °C



**Obrázek 17. 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid<sup>61</sup>**

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité chemikálie

2,4,6- trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid, Katedra farmaceutické chemie a analýzy, Faf UK v HK, ČR

Agar č., Oxoid, Velká Británie

Ajatin plus roztok 10%, Profarma – produkt s.r.o., ČR

Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, Faf UK v HK, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, ČR

Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR

Dusičnan draselný p.a. Lachema, ČR

Edetan sodný p.a., Sigma – Aldrich, USA

Etanol 96%, Lachema, ČR

Glycin p.a., Penta, ČR

Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovensko

Chlorid kobaltnatý hexahdrát p.a., Lachema, ČR

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Penta, ČR

Jodid draselný p.a., Penta, ČR

Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR

Kyselina nikotinová, Sigma-Aldrich, USA

Kyselina fosforečná R- čistota pro analýzy, Penta, ČR

Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR

Metanol p.a., Penta, ČR

Myo-inositol č., Fluka, Švýcarsko

Pyridin č., Sigma- Aldrich, USA

Pyridoxin č., Sigma- Aldrich, USA

Růstový stimulátor kyselina  $\alpha$ -naftyloctová, Sigma-Aldrich, USA

Sacharosa p.a., Lachema, ČR

Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR  
Síran manganatý tetrahydrát p.a., Lachema, ČR  
Síran mědnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR  
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR  
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR  
Standardy: rutin, hyperosid, hypericin, kvercetin p.a., Thiamin, Sigma- Aldrich, USA  
Ultračistá voda, Katedra analytické chemie, Faf UK v HK, ČR

## ***5.2 Pomůcky a přístrojové vybavení***

Analytické váhy PRLT A13, Sartorius, Německo  
Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR  
Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko  
Box s laminárním prouděním Fatran LF, Slovensko  
Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko  
Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko  
Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko  
Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, ČR  
Kolona LiChrospher RP-18 250x4, sorbent Chrospher 5um, Merck, Německo  
Fluorescentní detektor Jasco FP a2020 Plus, Japonsko  
Mikrofiltry (0,20 um), Corning NY 14831, Německo  
Pipetovací balonek, Filip, Německo  
Předkolona, Merck, Německo  
Sušárna HS 61A, Chirana, ČR  
Termostat kolony Jetsream 2 Plus, Japonsko  
Těsnění na vialky, Labicom s.r.o, ČR  
Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR  
Vodní lázeň GFL, typ 1042  
Třepačka KS 15 A Control, Edmund Bühler, Německo

### **5.3 Rostlinný materiál**

Pro tvorbu vlastní kultury jsem odebrala explantát z rostliny *Hypericum perforatum L.* K provedení pokusu jsem použila suspenzní a kalusovou kulturu z třezalky tečkované pasáže č. 153-158.

### **5.4 Příprava a složení živného média**

Kultivace suspenzní a kalusové kultury třezalky tečkované probíhala za použití živného média dle Murashigeho a Skooga<sup>62</sup> s pomocí růstového stimulatoru kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové ( $\alpha$ -NAO) o koncentraci 1mg/l živného média<sup>62</sup>.

Příprava kultivačního média probíhala připravením baňky o objemu 1000 ml, do které jsem přidala následující substance. Z důvodu jejich nízkých koncentrací jsem pro přesnou a snadnou manipulaci připravila jejich zásobní roztoky, ze kterých jsem odebírala následující objemy pomocí pipety<sup>62</sup>:

- 100ml makroelementů
- 10ml železnatého komplexu
- 1ml mikroelementů
- 1ml glycinu
- 1ml vitamínů
- 1ml kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové

Tyto složky jsem následně zředila 500ml destilované vody. Navážila na analytických vahách zbývající složky a přidala je k připravovanému médiu<sup>62</sup>:

- 30,0g sacharosy
- 0,1000g myo-inositolu
- 1,000g hydrolyzátu kasein

Po přidání těchto složek jsem doplnila odměrnou baňku destilovanou vodou po rysku. Všechny složky jsem řádně promísila a nechala rozpustit. Poté jsem pomocí odměrného válce odebrala po 30 ml kultivačního média, které jsem přelila do 100 ml vysterilizovaných Erlenmeyerových baněk, které jsem překryla aluminiovou fólií a sterilizovala po dobu 20 minut v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa. Pro kultivaci kalusových kultur jsem do baněk vložila můstek z papírového filtru<sup>62</sup>.

Složení kultivačního média podle Murashigeho a Skooga<sup>62</sup>:

**Makroelementy (mg/l):**

KNO <sub>3</sub>	1900,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440,000
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	170,000

**Mikroelementy (mg/l):**

MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	11,500
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
KI	0,830
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025

**Železnatý komplex (mg/l):**

Na <sub>2</sub> EDTA	37,340
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,840

**Vitaminy(mg/l):**

Pyridoxin	0,500
Kyselina nikotinová	0,500
Thiamin	0,100

**Další složky (mg/l):**

Sacharosa	30000,000
Hydrolyzát kaseinu	1000,000
Myo-inositol	100,000
Glycin	2,000

## 5.5 Příprava kalusových kultur

Příprava kalusových a suspenzních kultur probíhá za aseptických podmínek v laminárním boxu s ustáleným rovnoměrným laminárním prouděním. Box byl vždy sterilizován roztokem Ajatinu (1:10) a vysvícen UV zářením pomocí germicidní lampy. Pro kultivaci kultur jsem použila 100 ml vysterilizované Erlenmeyerové baňky, vyrobené z varného skla. Do každé baňky jsem přelila 30 ml živného média, hrdla překryla alobalem a nechala sterilizovat 20 minut v autoklávu při 121 °C a tlaku 0,1 MPa. U kalusových kultur je nutné vložit do baňky s živným médiem můstek z filtračního papíru. Pro dodržení aseptických podmínek jsem ošetřila hrdla s hliníkovou fólií etanolem 96%. Pinzety potřebné k pasážování kultur jsem omyla lihem, zabalila do aluminiové fólie a při 200 °C sterilizovala v horkovzdušném sterilizátoru po dobu 2 hodin.

Z narostlých kalusových kultur jsem pomocí pinzety odebrala malou část o velikosti cca 1 cm<sup>3</sup> a umístila ji na papírový můstek do baňky s čerstvě připraveným médiem a znovu překryla alobalem, aby nedošlo ke kontaminaci. Při odběru jsem vybírala co nejnovější a nejsvětlejší kalusové buňky, tmavé odumřelé nebo kontaminované buňky nebyly dále využity pro pasážování. Z jedné kultury jsem vytvořila základ pro tři nové kalusové kultury. Růst probíhal v kultivační místnosti při teplotě 25 °C a fotoperiodě, kdy byla 8 hodin tma a 16 hodin světlo. Pasážování probíhalo obvykle 4-5 týdnů, kdy z čerstvě odebraného vzorku narostl kalus.

## 5.6 Příprava suspenzních kultur

Příprava suspenzních kultur probíhala také za aseptických podmínek v laminárním boxu. Z narostlých kalusových kultur jsem odebrala malý shluk buněk, který jsem přenesla do Erlenmeyerovy baňky s živným médiem a pomocí pinzety rozmělnila. Do baňky se tentokrát neumísťoval papírový můstek. Kultivace suspenzních kultur probíhala opět v kultivační místnosti za teploty 25 °C a s délkou trvání světla po dobu 16 hodin a tmy po dobu 8 hodin. Na rozdíl od kalusových kultur byly baňky umístěny na třepačku s rychlostí otáček 250 za minutu, která zajišťovala nepřetržité míchání a provzdušňování kultur.

## 5.7 Příprava elicitoru

K provedení elicítace u suspenzní a kalusové kultury *Hypericum perforatum* L. byl připraven roztok 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamidem, zkratkou EM17.

Roztok byl připraven ve třech koncentracích:

$$c_1 = 100,0 \text{ mg} / 100 \text{ ml} \quad (3,6057 \times 10^{-3} \text{ mol/l})$$

$$c_2 = 10,0 \text{ mg} / 100 \text{ ml} \quad (3,6057 \times 10^{-4} \text{ mol/l})$$

$$c_3 = 1,00 \text{ mg} / 100 \text{ ml} \quad (3,6057 \times 10^{-5} \text{ mol/l})$$

První koncentraci ( $c_1$ ) jsem připravila navážením 100mg elicitoru 2,4,6- trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamidu na analytických vahách. Navážku jsem přenesla do 100 ml odměrné baňky a nechala rozpustit doplněním horkého etanolu po rysku.

Druhou koncentraci ( $c_2$ ) jsem připravila vyjmutím 10ml roztoku z odměrné baňky o koncentraci  $c_1$  a převedla do 100ml odměrné banky a doplnila etanolem po rysku.

Třetí koncentraci ( $c_3$ ) jsem připravila vyjmutím 10ml roztoku odměrné baňky o koncentraci  $c_2$ , převedla do 100ml odměrné baňky a doplnila etanolem po rysku.

## **5.8 Elicitace in vitro kultur**

Elicitace kalusových a suspenzních kultur probíhala v laminárním boxu s ustáleným prouděním, který byl vydezinfikován roztokem Ajatinu (1:10) a vysvícen UV zářením pomocí germicidní lampy. Před přenesením kultur do laminárního boxu jsem hrdla baněk pokryla alobalem, ošetřila buničinou navlhčenou 96% etanolem. Elicitor a kontrolní roztok jsem přidala ke kulturám pomocí pipet vysterilizovaných v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200 °C.

Elicitaci jsem prováděla s 34 baňkami u kalusových kultur narostlých po 4 týdnech a u stejného počtu suspenzních kultur, u kterých růst probíhal po dobu 3 týdnů. Baňky jsem rozdělila na dvě skupiny, kde ke 25 kulturám jsem přidala 1 ml roztoku elicitoru a do zbylých 9 baněk, které sloužily jako kontrolní vzorky, jsem přidala 1ml ethanolu, všechny kultury jsem řádně označila. Kultury byly znovu překryty aluminiovou fólií a uchovávány v kultivační místnosti při teplotě 25 °C a za pravidelného střídání světelného režimu, kdy přítomnost světla byla 16 hodin a tma trvala po dobu 8 hodin. Suspenzní kultury byly umístěny na třepačku s rychlostí 250 otáček za minutu. Baňky podléhající elicitaci jsem odebírala postupně po 5 kultivačních baňkách v předem stanovených časových intervalech po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách expozice elicitoru, kontrolní baňky jsem odebírala vždy po 3 kulturách po 6, 48 a 168 hodinách.

Odebrané kalusové a suspenzní kultury jsem separovala od živných médií pomocí filtrace a nechala je uschnout na filtračním papíře za laboratorní teploty. Jelikož jsem sledovala i uvolnění látek do kultivačního média, přelila jsem jednotlivé filtráty do lékovek a nechala je zmrazit při teplotě -18°C. Usušené vzorky jsem zabalila do alobalu a uchovala k přípravě metanolových extraktů a následné HPLC analýze. Postupy byly stejné u všech koncentrací  $c_1$ ,  $c_2$  a  $c_3$  u kalusových i suspenzních kultur.

## **5.9 Stanovení obsahu**

Usušené kalusové a suspenzní kultury jsem postupně rozmělnila v třence s tloučkem a zvážila na analytických vahách a zaznamenala jejich hmotnost s přesností na 4 desetinná místa. Upráškované kalusy jsem převedla do varné baňky o objemu 50 ml a přidala 10 ml 80% metanolu s varnými kamínky. Připravenou Erlenmeyerovu baňku jsem umístila na vodní lázeň, kde došlo k extrakci pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Po uplynutí doby jsem odebrala baňku a zfiltrovala extrakt přes chomáč vaty do odměrné baňky o objemu 25 ml. Chomáč vaty i s ulpělými zbytky kalusu jsem vpravila znovu do varné baňky a přidala 10 ml 80 % metanolu. Varnou baňku se zbytky kalusu jsem dala znovu na vodní lázeň a podruhé extrahovala pod zpětným chladičem po dobu 10 minut a poté znovu zfiltrovala přes chomáč vaty a daný filtrát převedla do odměrné baňky s prvním filtrátem a doplnila 80% metanolem po rysku. Filtrát s metanolem jsem v odměrné baňce pořádně promísila a pomocí injekční stříkačky odebrala 1,7 ml a následně

přefiltrovala přes nylonový mikrobiální filtr s velikostí pórů 0,20 µm do vialky, které jsem označila a uchovala k provedení HPLC analýzy.

Zmražená kalusová a suspenzní média jsem vyndala z mrazáku a nechala je rozmrazit za laboratorní teploty. Poté jsem odebrala 10 ml média do odpařovací misky a přemístila ji na vodní lázeň do úplného odpaření média. K odparku jsem přidala 5 ml 80% metanolu a za jeho občasného míchání došlo k rozpuštění. Po 10 minutách jsem odebrala 1,7 ml pomocí injekční stříkačky a přes nylonový mikrobiální filtr (0,2 µm) převedla do vialky. Všechny vialky určené k HPLC analýze se označené uchovávaly v chladničce.

### 5.9.1 HPLC analýza

Ke stanovení obsahu sekundárních metabolitů hyperosidu, hypericinu, rutinu a kvercetinu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Konkrétně sestava JASCO (čerpadlo Jasco PU-2089, autosampler AS-2055, termostat Jetstream II plus, kolona LiChrosper RP-18 250x4 (5µm), detektor MD-2015).

#### Parametry stanovení hyperosidu a kvercetinu:

- gradientová eluce, 23 minut
- eluent A: 8% acetonitril, 0,15% kyseliny fosforečná
- eluent B: 100% acetonitril
- eluční profil:

**Tabulka 2. Složení mobilní fáze během gradientové eluce.**

Čas (min)	% eluent A	% eluent B
0-10	90	10
10-23	80	20
23	75	25

- rychlost průtoku: 1,5 ml/min
- nástřik: 20 ul
- hyperosid s kvercetinem byli detekovány v rozsahu vlnových délek mezi 200-650 nm (obsah metabolitů byl vypočten z píků při 254 nm)

**Parametry stanovení rutinu:**

- isokratická eluce – složení fáze se v čase nemění
- gradientová eluce – složení mobilní fáze se měnilo v čase podle tabulky:

***Tabulka 3. Složení mobilní fáze během gradientové eluce.***

Čas (min)	% eluentu A	% eluentu B
0	96	4
6	96	4
16,5	80	20
22	65	35
23	60	40

- eluent A: 5% acetonitril + 0,15 H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> ve vodě
- eluent B: 100% acetonitril
- rychlost průtoku: 1 ml/min
- nástřik: 20 ul
- rutin byl detekován v rozsahu vlnových délek 200-450 nm (při výpočtu obsahu rutinu se vycházelo z píků při vlnové délce 350 nm)

**Parametry stanovení hypericinu:**

- gradientová eluce, 12 minut
- eluent A: 8% acetonitril, 0,15 % kyselina fosforečná
- eluent B: 100% acetonitril
- eluční profil:

**Tabulka 4. Složení mobilní fáze během gradientové eluce.**

Čas (min)	% eluent A	% eluent B
0-12	45	55
12	10	90

- hypericin byl detekován v rozsahu vlnových délek mezi 200–600 nm (z píků při 590 nm bylo stanoveno množství metabolitů)

Na základě srovnání jednotlivých píků vzorků a příslušných standardů a za pomoci programu Jasco software ChromPass jsme dokázali určit koncentrace sekundárních metabolitů.

## **5.10 Statické zpracování výsledků**

### **5.10.1 Aritmetický průměr**

Aritmetický průměr je definován jako součet všech naměřených hodnot dělený celkovým počtem měření. Určuje střední hodnotu získanou opakovaným měřením stanovované veličiny, podle následujícího vzorce:

$$x = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots x_n)$$

Případně podle vzorce:

$$x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

x = aritmetický průměr

x<sub>i</sub> = jednotlivé hodnoty

n = počet členů souboru

## 5.10.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka vyjadřuje o kolik se naměřené hodnoty liší od střední (průměrné hodnoty). Lze ji vypočítat podle následujícího vztahu:

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

s = směrodatná odchylka

$x_i$  = hodnota sledované veličiny

$\bar{x}$  = průměrná hodnota sledované veličiny

n = počet členů souboru

## 5.10.3 T-test

T-test je důležitým statistickým parametrem sloužící k určení statistické významnosti, která se vypočítá z rozdílu dvou středních průměrných hodnot, nejčastěji mezi kontrolní a zkoušenou hodnotou. Podle testovacího kritéria lze odvodit úspěšnost elicítace in vitro. Platí pro něj následující vztah:

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

t = testovací kritérium

$x_1$  = aritmetický průměr kontrolního souboru

$x_2$  = aritmetický průměr pokusného souboru

$n_1$  = počet členů kontrolního souboru

$n_2$  = počet členů pokusného souboru

$s_1$  = směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$  = směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení s vypočteným stupněm volnosti podle následujícího vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Výpočtem získaná hodnota testovacího kritéria se srovnává s tabulkovou kritickou hodnotou  $t(v)_p$  pro určitý stupeň volnosti a vybranou hladinou významnosti  $p$ . Za statisticky významný rozdíl  $|x_1 - x_2|$  se považuje, když hodnota  $t$  je vyšší než hodnota  $t(v)_p$ .

Při analýze obsahu sekundárních metabolitů se prováděla pro každý vzorek tři paralelní stanovení s počtem členů souboru  $n_1 = n_2 = 3$  a počtem stupňů volnosti  $v=4$ . Pro daný počet stupňů volnosti a hladinu významnosti  $p= 0,05$  je kritická hodnota testovacího kritéria rovna  $t(v)_p=2,78$ . Dosahuje-li vypočtené testovací kritérium vyšších hodnot než je uvedená tabelovaná kritická hodnota, považujeme výsledky za statisticky významné.

Při stanovení hodnot testovacího kritéria byla pro výpočet při odběrech po 6 a 24 hodinách využita kontrolní hodnota po 6 hodinách, pro odběry po 48 a 72 hodinách byla využita kontrolní hodnota po 48 hodinách a u odběru po 168 hodinách byla využita kontrolní hodnota po 168 hodinách<sup>63,64</sup>.

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1 Tabulky

**Tabulka 5.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetinů [mg/g DW] v kalusové kultuře po působení elicitoru ve třech různých koncentracích:

A.	Koncentrace elicitoru $c_1$ (100mg/100ml)								
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0,012	0,003	0,001	0,002	0,00045	0,0001	0	0	3,4299
6K	0,012	0,003	0,002	0,001	0,00014	0,0004	-	-	-
24	0,010	0,001	0	0,002	0,00020	0	1,2649	11,5857	7,0711
48	0,006	0	0	0,001	0	0	<b>8,4852</b>	0	0
48K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
72	0,006	0	0	0,0012	0	0	<b>7,0000</b>	0	0
168	0,169	0	0	0,0590	0	0	<b>3,8351</b>	0	0
168K	0,009	0	0	0,0003	0	0	-	-	-

<b>B.</b>		<b>Koncentrace elicitoru c<sub>2</sub> (10mg/100ml)</b>								
<b>Odběr</b>	<b>Obsah [mg/g DW]</b>			<b>Směrodatná odchylka</b>			<b>Testovací kritérium</b>			
	<b>[hod]</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>
<b>6</b>	0,008	0,003	0	0,00035	0,00032	0	<b>10,6430</b>	<b>8,1888</b>	0	
<b>6K</b>	0,004	0,001	0	0,00040	0,00013	0	-	-	-	
<b>24</b>	0,004	0,001	0	0,00050	0,00030	0	0	0	0	
<b>48</b>	0,003	0	0	0,00018	0	0	<b>5,2559</b>	0	0	
<b>48K</b>	0,002	0	0	0,00020	0	0	-	-	-	
<b>72</b>	0,005	0	0,001	0,00037	0	0	<b>10,0872</b>	0	0	
<b>168</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>168K</b>	0	0	0	0	0	0	-	-	-	

<b>C.</b>		<b>Koncentrace elicitoru c<sub>3</sub> (1mg/100ml)</b>								
<b>Odběr</b>	<b>Obsah [mg/g DW]</b>			<b>Směrodatná odchylka</b>			<b>Testovací kritérium</b>			
	<b>[hod]</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>
<b>6</b>	0,011	0,002	0	0,0005	0	0	<b>7,2429</b>	<b>6,3246</b>	0	
<b>6K</b>	0,007	0,001	0	0,0006	0,0002	0	-	-	-	
<b>24</b>	0,006	0	0	0,0008	0	0	1,4142	7,0711	0	
<b>48</b>	0,008	0	0	0,0003	0	0	<b>3,9223</b>	0	0	
<b>48K</b>	0,007	0	0	0,0002	0	0	-	-	-	
<b>72</b>	0,005	0,001	0,001	0,0007	0,0003	0,0006	3,8850	<b>4,7140</b>	0,8165	
<b>168</b>	0,004	0	0	0,0004	0	0	<b>3,3104</b>	0	0	
<b>168K</b>	0,003	0	0	0,00015	0	0	-	-	-	

**Tabulka 6.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetinů [mg/g DW] v suspenzní kultuře po působení elicitoru ve třech různých koncentracích:

A. Koncentrace elicitoru $c_1$ (100 mg/100ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6K	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48K	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168K	0	0	0	0	0	0	0	0	0

B. Koncentrace elicitoru $c_2$ (10mg/100ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4708
6K	0	0	0,026	0	0	0,025	-	-	-
24	0	0	0,033	0	0	0,021	0	0	0,3032
48	0	0	0,010	0	0	0,011	0	0	1,2856
48K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0	0	2,6189	0	0
168K	0,005	0	0	0,0027	0	0	-	-	-

C.		Koncentrace elicitoru c <sub>3</sub> (1mg/100ml)							
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
72	0,011	0	0	0,0015	0	0	10,3709	0	0
168	0	0	0	0	0	0	0	0	7,0711
168K	0	0	0,015	0	0	0,003	-	-	-

**Tabulka 7.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetinu [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] v médiích kalusových kultur po působení elicitoru ve třech různých koncentracích:

A.		Koncentrace elicitoru c <sub>1</sub> (100mg/100ml)							
Odběr [hod]	Obsah [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0,66	0	0	0,03	0	0	4,1310	0	0
6K	0,35	0	0	0,10	0	0	-	-	-
24	0,48	0	0,011	0,35	0	0	0,5050	0	4,4400
48	0,63	0	0	0,21	0	0,0035	2,5110	0	0
48K	1,03	0	0	0,08	0	0	-	-	-
72	0,73	0	0	0,19	0	0	2,0510	0	0
168	0,41	0	0	0,32	0	0	1,5170	0	0
168K	0,77	0	0	0,11	0	0	-	-	-

<b>B. Koncentrace elicitoru c<sub>2</sub> (10mg/100ml)</b>									
<b>Odběr</b>	<b>Obsah [µg/ml]</b>			<b>Směrodatná odchylka</b>			<b>Testovací kritérium</b>		
	<b>[hod]</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>
<b>6</b>	0,88	0	0	0,09	0	0	0,6040	0	0
<b>6K</b>	1,03	0	0	0,33	0	0	-	-	-
<b>24</b>	1,77	0	0	0,13	0	0	2,9550	0	0
<b>48</b>	0,54	0	0	0,25	0	0	0,5270	0	0
<b>48K</b>	0,42	0	0	0,22	0	0	-	-	-
<b>72</b>	0,59	0	0	0,40	0	0	0,5450	0	0
<b>168</b>	1,04	0	0	0,12	0	0	1,9400	0	0
<b>168K</b>	0,58	0	0	0,31	0	0	-	-	-

<b>C. Koncentrace elicitoru c<sub>3</sub> (1mg/100ml)</b>									
<b>Odběr</b>	<b>Obsah [µg/ml]</b>			<b>Směrodatná odchylka</b>			<b>Testovací kritérium</b>		
	<b>[hod]</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>	<b>kvercetin</b>	<b>rutin</b>	<b>hyperosid</b>
<b>6</b>	0,93	0	0	0,33	0	0	0,3520	0	0
<b>6K</b>	0,83	0	0	0,25	0	0	-	-	-
<b>24</b>	0,40	0	0	0,22	0	0	1,8010	0	0
<b>48</b>	0,61	0	0	0,40	0	0	0,1930	0	0
<b>48K</b>	0,55	0	0	0,04	0	0	-	-	-
<b>72</b>	0,63	0	0	0,20	0	0	0,5480	0	0
<b>168</b>	0,87	0	0	0,30	0	0	0,7300	0	0
<b>168K</b>	0,70	0	0	0,17	0	0	-	-	-

**Tabulka 8.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) v médiích suspenzních kultur po působení elicitoru ve třech různých koncentracích:

<b>A.</b> Koncentrace elicitoru $c_1$ (100mg/100ml)									
Odběr [hod]	Obsah [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0,43	0	0	0,03	0	0	1,3270	0	0
6K	0,53	0	0	0,10	0	0	-	-	-
24	0,65	0	0	0,35	0	0	0,4700	0	0
48	0,63	0	0	0,21	0	0	0,4580	0	0
48K	0,70	0	0	0,08	0	0	-	-	-
72	3,36	0	0	0,19	0	0	18,2270	0	0
168	1,66	0	0	0,32	0	0	1,5380	0	0
168K	1,29	0	0	0,11	0	0	-	-	-

<b>B.</b> Koncentrace elicitoru $c_2$ (10mg/100ml)									
Odběr [hod]	Obsah [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0,21	0	0	0,09	0	0	3,3000	0	0
6K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
24	0,27	0	0	0,13	0	0	2,9590	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0,61	0	0	0,12	0	0	0,7740	0	0
168K	0,42	0	0	0,31	0	0	-	-	-

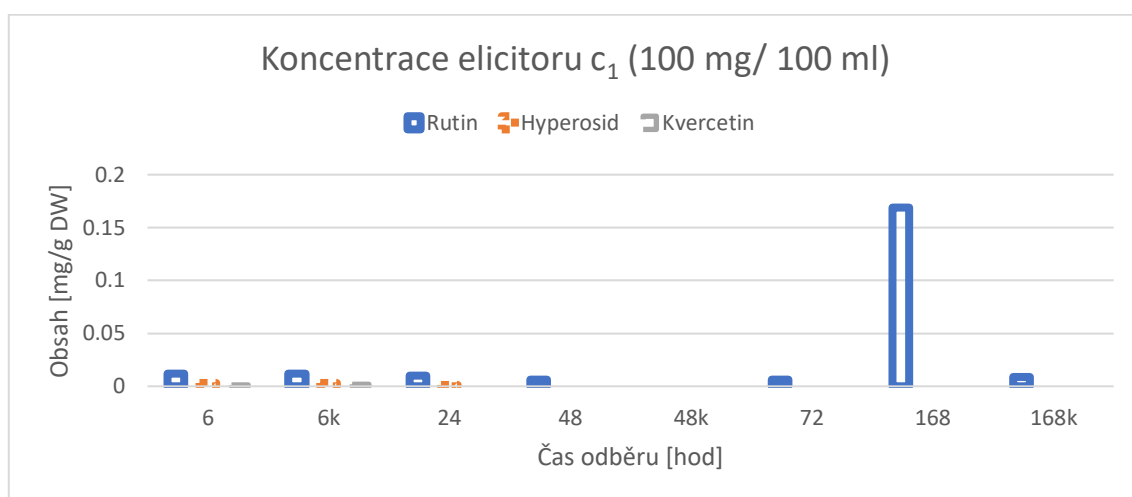
C. Koncentrace elicitoru c <sub>3</sub> (1mg/100ml)									
Odběr [hod]	Obsah [µg/ml]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin	rutin	hyperosid	kvercetin
6	0,44	0	0	0,33	0	0	1,1270	0	0
6K	0,77	0	0	0,25	0	0	-	-	-
24	0,47	0	0	0,22	0	0	1,2440	0	0
48	0,83	0	0	0,40	0	0	0,0530	0	0
48K	0,81	0	0	0,04	0	0	-	-	-
72	1,23	0	0	0,20	0	0	2,8570	0	0
168	1,22	0	0	0,30	0	0	6,1560	0	0
168K	2,73	0	0	0,17	0	0	-	-	-

Jako „K“ jsou označovány kontrolní vzorky, kde místo 1 ml elicitoru je přidán 1 ml etanolu. Anglickým spojením Dry Weight, zkratkou „DW“ je označována hmotnost sušiny. Tučným písmem jsou vyznačeny statisticky významné hodnoty. Tučně jsou zvýrazněné statisticky významné hodnoty.

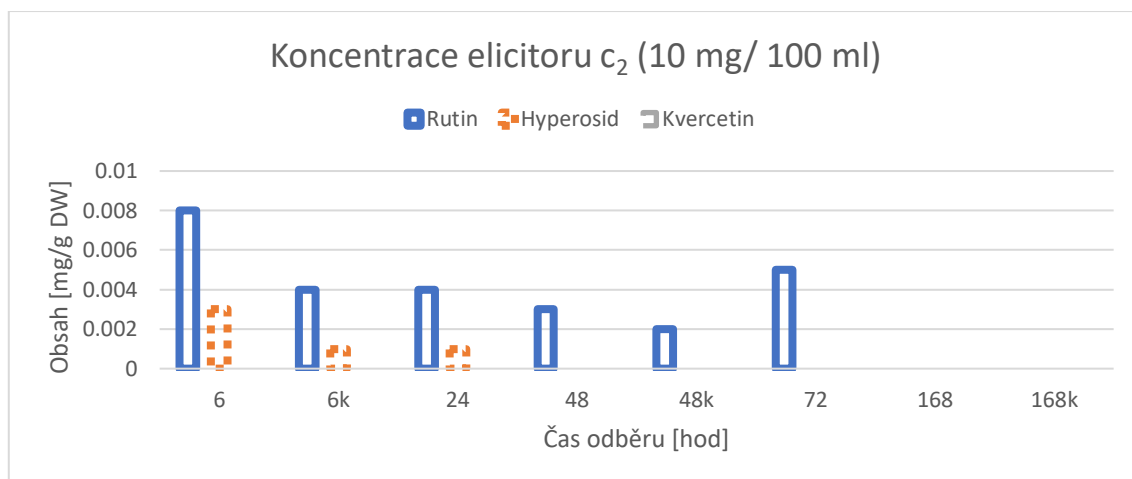
## 6.2 Grafy

### 6.2.1 Kalusové kultury

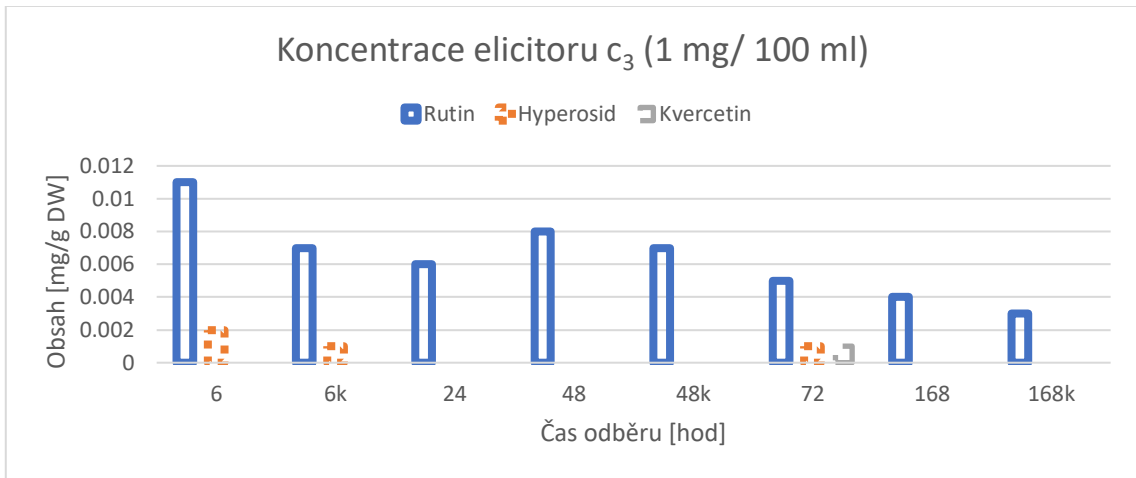
**Graf 1.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetinů (mg/g DW) v kalusové kultuře po působení elicitoru v koncentraci  $c_1$



**Graf 2.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetinů (mg/g DW) v kalusové kultuře po působení elicitoru v koncentraci  $c_2$

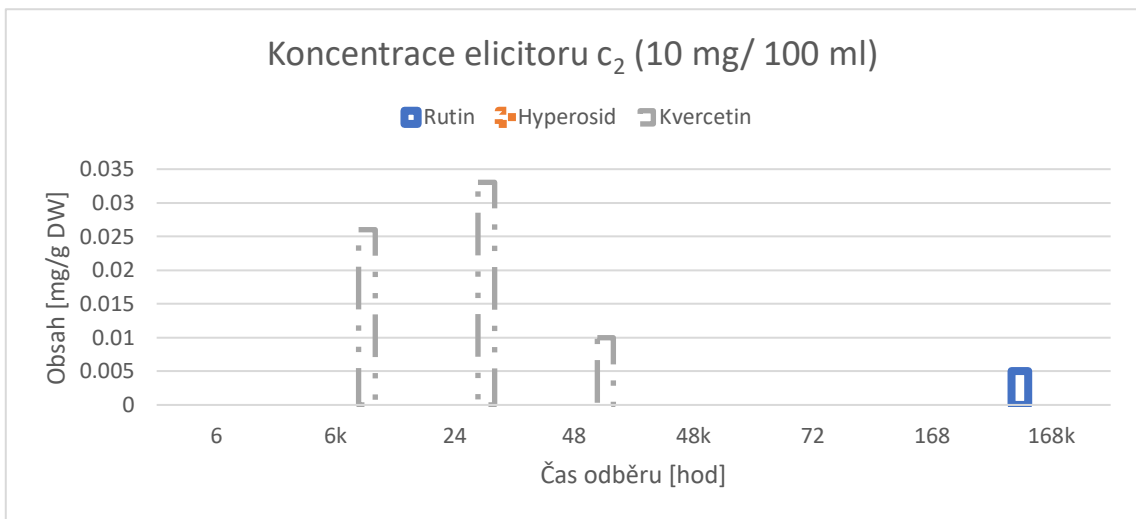


**Graf 3.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin (mg/g DW) v kalusové kultuře po působení elicitoru v koncentraci  $c_3$

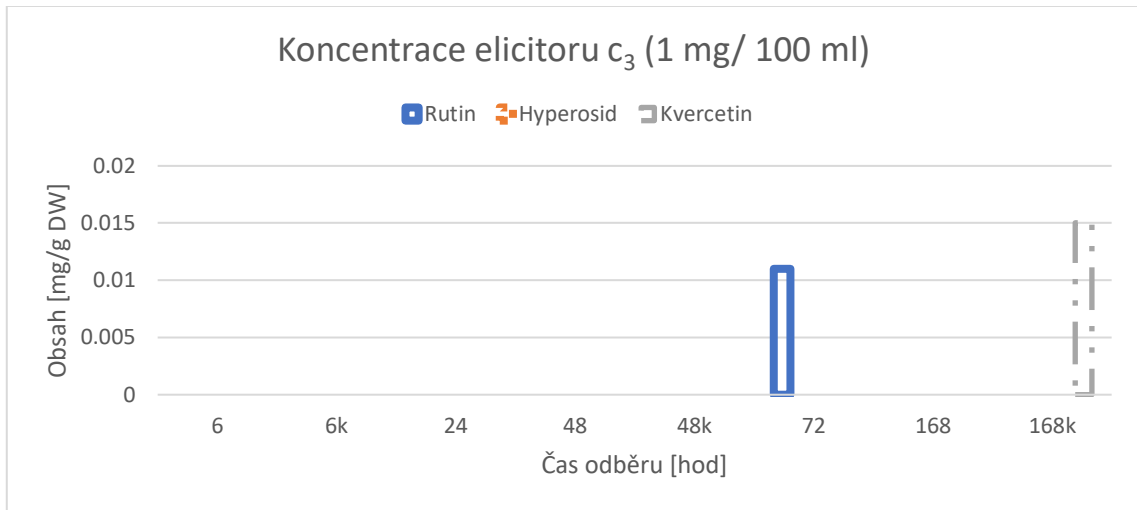


## 6.2.2 Suspenzní kultury

**Graf 4.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin (mg/g DW) v suspenzní kultuře po působení elicitoru v koncentraci  $c_2$



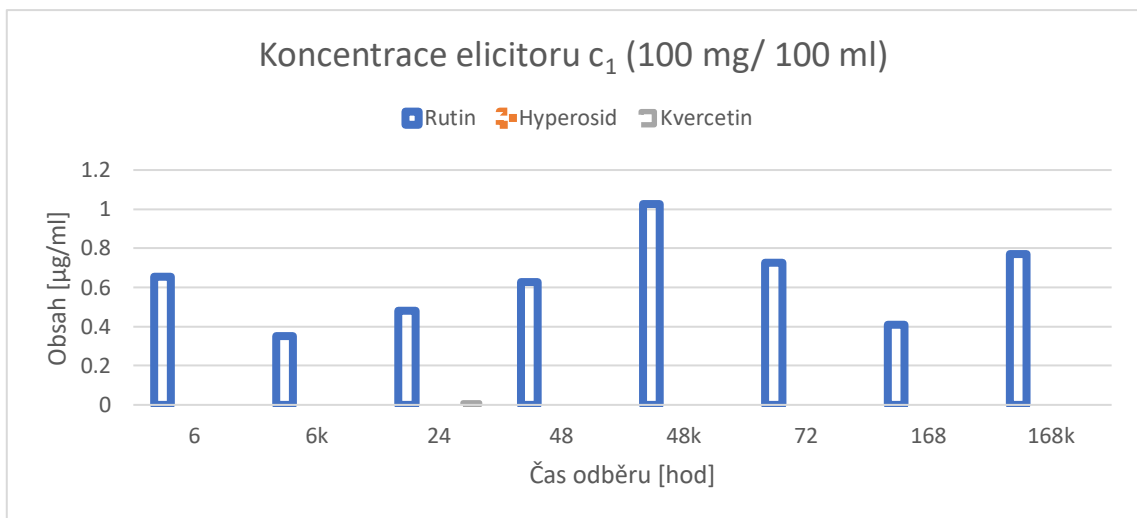
**Graf 5.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin (mg/g DW) v suspenzní kultuře po působení elicitoru v koncentraci  $c_3$



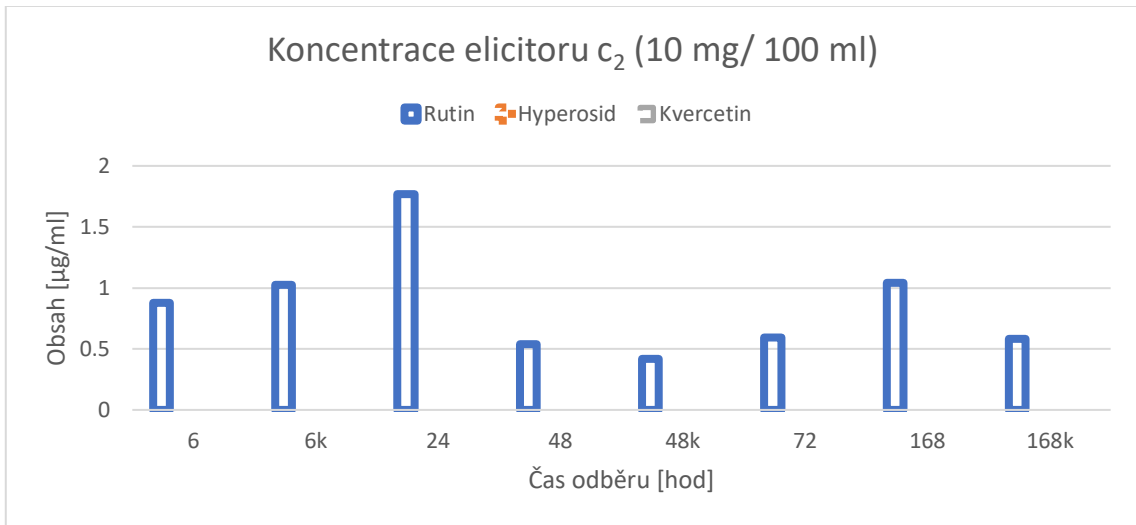
Elicitor v koncentraci  $c_1$  neovlivnil produkci sekundárních metabolitů, proto není vložen graf.

### 6.2.3 Kalusová média

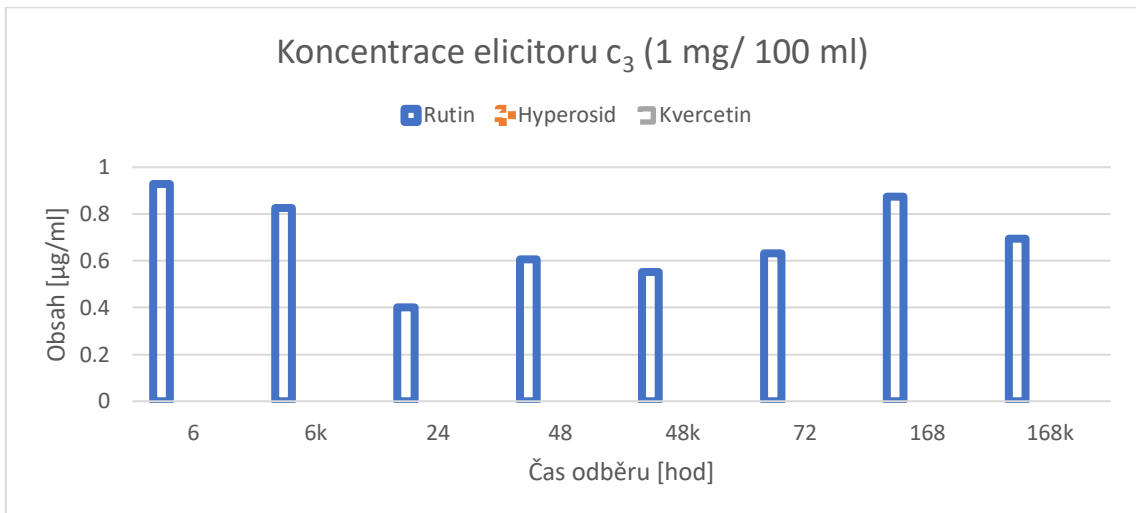
**Graf 6.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) v kalusovém médiu po působení elicitoru v koncentraci  $c_1$



**Graf 7.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) v kalusovém médiu po působení elicitoru v koncentraci  $c_2$

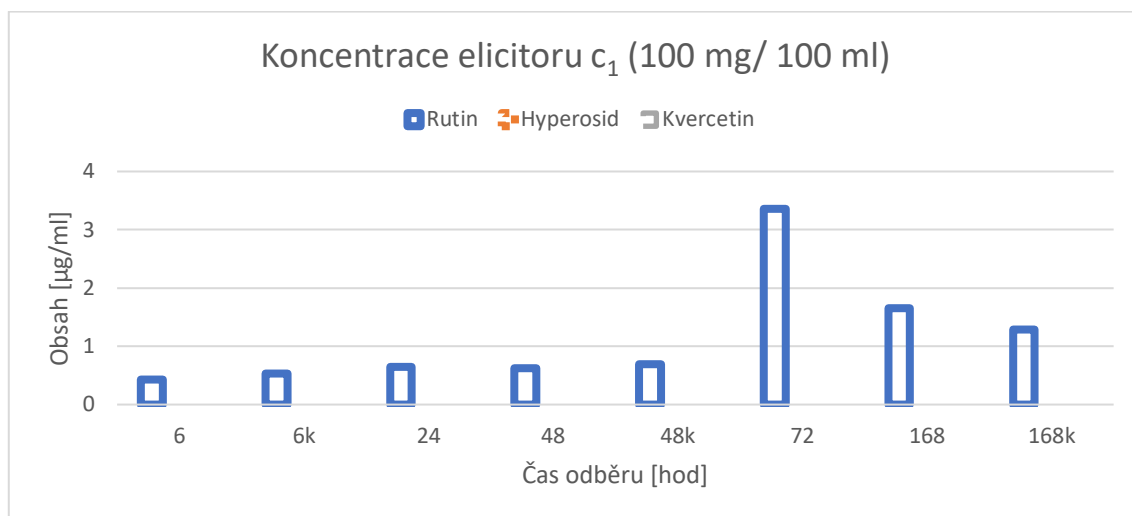


**Graf 8.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) v kalusovém médiu po působení elicitoru v koncentraci  $c_3$

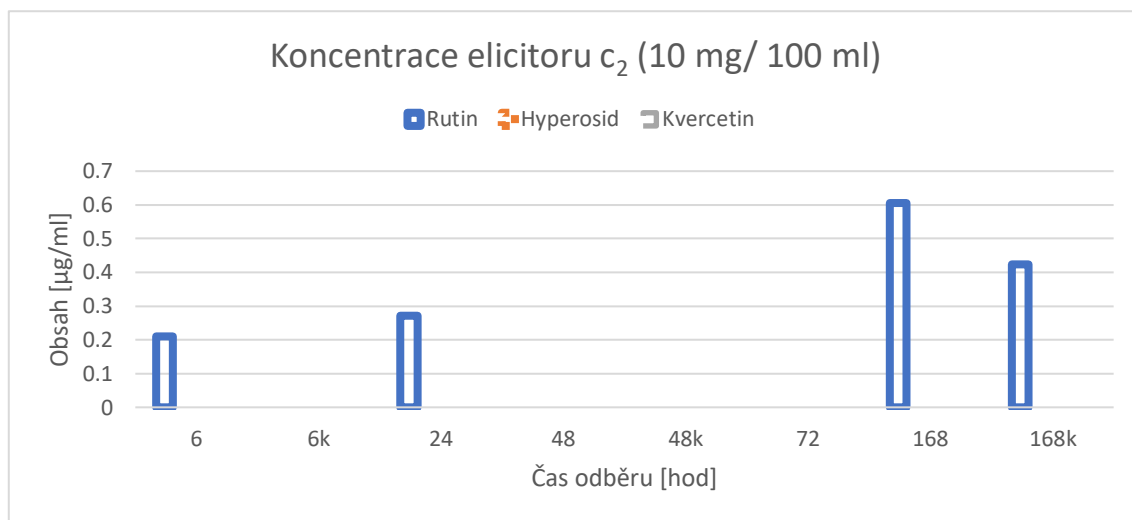


## 6.2.4 Suspenzní média

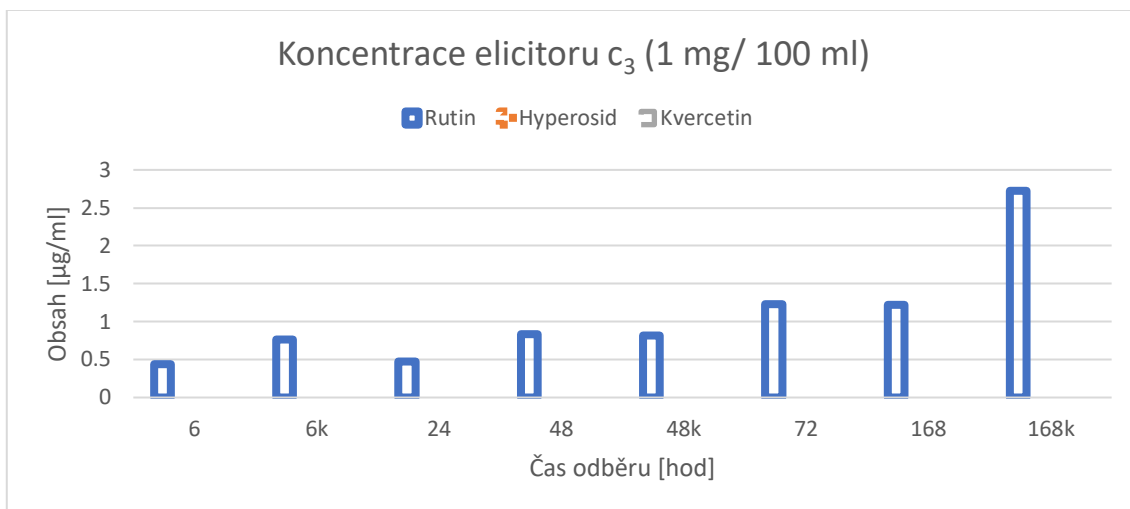
**Graf 9.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) v suspenzním médiu po působení elicitoru v koncentraci  $c_1$



**Graf 10.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) v suspenzním médiu po působení elicitoru v koncentraci  $c_2$



**Graf 11.** Obsah rutinu, hyperosidu a kvercetinů ( $\mu\text{g/ml}$ ) v suspenzním médiu po působení elicitoru v koncentraci  $c_3$



## 7. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo seznámit se s metodou kultivace explantátových kultur *in vitro* a zjistit vliv abiotického elicitoru na produkci sekundárních metabolitů v kalusové a suspenzní kultuře.

K provedení pokusu byla použita kalusová kultura *Hypericum perforatum L.* z pasáže č. 153-157. Suspenzní kultura byla vytvořena mechanickým rozmělněním kalusové kultury. Jako živné médium vhodné pro kultivaci bylo vybráno médium dle Murashigeho a Skooga, obohaceno o růstový stimulant kyseliny  $\alpha$ -naftylactovou ( $\alpha$ -NAO) o koncentraci 1mg/l.

Abiotickým elicitem byl 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid, který byl ke kulturám přidáván ve třech různých koncentracích:

- $c_1 = 100,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  ( $3,6057 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ )
- $c_2 = 10,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  ( $3,6057 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ )
- $c_3 = 1,00 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  ( $3,6067 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ )

Jednotlivé vzorky byly odebírány po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Kontrolní vzorky, které obsahovaly pouze čistý etanol bez přítomnosti elicitoru, byly odebírány po 6, 48 a 168 hodinách. Spolu se vzorky byla odebírána i živná média jednotlivých kultur. Kultury byly uchovávány v kultivační místnosti při teplotě 25 °C a pravidelné fotoperiodě, kdy přítomnost světla byla 16 hodin a tmy 8 hodin. Suspenzní kultury byly umístěny na třepačku s rychlostí otáček 250/min.

Obsah sekundárních metabolitů produkovaných vlivem elicitoru se stanovoval pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Stanovoval se obsah rutinu, hyperosidu, hypericinu a kvercetinu.

### Kalusové kultury:

Působením elicitoru v koncentraci  $c_1$  ( **$3,6057 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$** ) bylo zjištěno několik statisticky významných hodnot nárůstu produkce sledovaných sekundárních metabolitů. Nejvyšší produkce rutinu (0,169 mg/g DW) byla ale zaznamenána u elicitace po 168 hodinách, kde došlo k nárůstu o 1777 % oproti kontrole. Dále byla významně ovlivněna produkce rutinu po 6 (0,012 mg/g DW) a 24 (0,010 mg/g DW) hodinách elicitace. Produkce hyperosidu a kvercetinu nebyla elicítací významně ovlivněna. (tabulka 5A, graf 1)

Elicitor v koncentraci  $c_2$  ( **$3,6057 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$** ) významně ovlivnil produkci rutinu po 6 (0,008 mg/g DW), 48 (0,003 mg/g DW) a 72 hodinách (0,005 mg/g DW). Nejvyšší nárůst rutinu o 150 % oproti kontrole, byl naměřen po 72 hodinách působení elicitoru. Tato koncentrace elicitoru také významně ovlivnila produkci hyperosidu (0,003 mg/g DW) po 6 hodinách, kde došlo k nárůstu o 200 % oproti kontrole. Obsah kvercetinu nebyl významně ovlivněn. (tabulka 5B, graf 2)

Nejnižší testovaná koncentrace elicitoru  $c_3$  ( **$3,6067 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$** ) významně ovlivnila produkci rutinu ve třech případech po 6 (0,011 mg/g DW), 48 (0,008 mg/g DW) a 168 hodinách (0,004 mg/g DW). Nejvyšší nárůst rutinu o 60 % oproti kontrole, byl zaznamenán po 6 hodinách působení elicitoru. Kvercetin byl produkován pouze po 72 hodinách elicitace stejně jako u

koncentrace  $c_2$ , zato obsah hyperosidu byl významně ovlivněn po 6 a 72 hodinách působení elicitoru, kdy po 72 hodinách byla produkce hyperosidu zvýšena o 100 % oproti kontrole. (tabulka 5C, graf 3). Ani jedna koncentrace elicitoru neovlivnila produkci hypericinu, proto nebyly zaznamenány žádné hodnoty do grafu a tabulek.

#### Kalusová média:

Při elicitaci kalusových kultur došlo k uvolnění sledovaných sekundárních metabolitů i do živných médií, ale pouze v malém množství. Obsah hyperosidu nebyl detekován ani v jednom případě. Obsah kvercetinu byl naměřen pouze po 24 hod aplikaci elicitoru s koncentrací  $c_1$ . Rutin byl detekován ve všech kontrolních a pokusných vzorcích s tím, že největší obsah (1,77  $\mu\text{g/ml}$ ) byl naměřen po aplikaci elicitoru v koncentraci  $c_2$ . (tabulka 7A, B, C; graf 6, 7, 8)

#### Suspenní kultury:

U suspenních kultur po působení elicitoru v koncentraci  $c_1$  ( **$3,6057 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$** ) nebyla detekována přítomnost ani jednoho zmiňovaného sekundárního metabolitu. (tabulka 6A)

Obsah rutinu nebyl nalezen ani po působení elicitoru v koncentraci  $c_2$  ( **$3,6057 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$** ), malý obsah (0,005 mg/g DW) byl naměřen pouze u kontrolního vzorku po 168 hodinách. Kvercetin byl uvolňován do média pouze po 24 a 48 hodinách elicitace a v kontrolním vzorku po 6 hodinách. (tabulka 6B, graf 4)

Nejnižší koncentrace elicitoru  $c_3$  ( **$3,6067 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$** ) významně ovlivnila produkci rutinu po 72 hodinách (0,011 mg/g DW), kdy byla produkce zvýšena o 110 % oproti kontrole. V ostatních časech nebyl rutin detekován. Kvercetin (0,015 mg/g DW) byl zaznamenán pouze u kontrolního vzorku po 168 hodinách elicitace. Hyperosid nebyl produkován po aplikaci ani jedné koncentrace elicitoru. (tabulka 6C, graf 5) Ani jedna koncentrace elicitoru neovlivnila produkci hypericinu, proto nebyly zaznamenány žádné hodnoty do grafů a tabulek.

#### Suspenní média:

V případě médií suspenních kultur, došlo k uvolnění pouze rutinu po elicitaci suspenních kultur. Nejvyšší hodnota obsahu rutinu (3,36  $\mu\text{g/ml}$ ) byla naměřena po působení elicitoru v koncentraci  $c_1$  po 72 hodinách, co je zároveň největší naměřený obsah rutinu, který byl uvolněn do ze všech kalusových a suspenních médií. Druhý největší obsah uvolněného rutinu (2,73  $\mu\text{g/ml}$ ) do živného média byl naměřen v kontrolním vzorku po 168 hodinách. (tabulka 8A, B, C; graf 9, 10, 11)

Vlivem abiotických elicitorů na produkci sekundárních metabolitů u *Hypericum perforatum* se zabývalo několik prací:

- K. Sojková sledovala ve své práci vliv oxidu seleničitého na produkci kvercetinu a hyperosidu. Ke svému pokusu využila 105.- 110. pasáž kalusové a suspenní kultury třezalky tečkované. Nejvyšší hodnoty byly naměřené u suspenních kultur. V případě kvercetinu byl naměřen nejvyšší obsah 0,37 mg/g DW po 6 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = 9,012 \times 10^{-3}$ . Po 168 hodinách působení elicitoru ve stejné koncentraci byl naměřen obsah hyperosidu 0,2 mg/g DW<sup>65</sup>.

- J. Majerová sledovala vliv chloridu ceritého na produkci hyperosidu. Pokus byl proveden s kulturami třezalky tečkované pasáže č. 116-121. Stejně jako v předchozí práci byla zaznamenána nejvyšší produkce hyperosidu 0,27 mg/g DW u suspenzní kultury po 48 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_2 = 4,0571 \times 10^{-4}$  mol/l<sup>66</sup>.
- M. Slavík ve své diplomové práci sledoval vliv kyseliny křemičité na produkci hypericinu, hyperosidu a kvercetinu. Ke svému pokusu využil kultury třezalky tečkované č. 126-131. Produkce byla zvýšena hlavně u suspenzní kultury. Nejvyšší obsah hypericinu 0,21 mg/g DW byl naměřen po 12 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = 10,4047 \times 10^{-3}$  mol/l. Nejvyšší produkce hyperosidu 0,04 mg/g DW byla zaznamenána po 72 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = 10,4047 \times 10^{-3}$  mol/l<sup>67</sup>.

Vyšší produkci sekundárních metabolitů u suspenzních kultur lze vysvětlit větším povrchem shluků buněk, a tím snadnější interakcí mezi živným médiem a kulturou. V experimentu prováděném v této diplomové práci ale došlo k vyšší produkci u kalusových kultur. Příčinou téměř nulové produkce u suspenzních kultur a malé produkce u kalusových kultur je ve srovnání s výše zmiňovanými pracemi pravděpodobně stáří kultury, mladší kultura je citlivější a má rychlejší schopnost regenerace.

Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje produkci sekundárních metabolitů, je typ, koncentrace a doba působení elicitoru. Deriváty pyrazin-2-karboxamidu byly zkoumány v mnoha studiích jako abiotické elicitory. Výsledky ukazují, že deriváty pyrazin-2-karboxamidu pozitivně ovlivnily produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum*., odrůdě *Bamby* a produkci taxifolinu v kalusové a suspenzní kultuře *Sylibum marianum* v závislosti na době působení elicitoru<sup>59,60</sup>.

## 8. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sledovat vliv abiotického elicitoru 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamidu na produkci sekundárních metabolitů (rutinu, hyperosidu a kvercetin) v kalusové a suspenzní kultuře *Hypericum perforatum L.*

Z provedeného experimentu jsem získala následující informace:

- Pomocí HPLC analýzy byla ve vzorcích zjištěna přítomnost rutinu, hyperosidu a kvercetin.
- Vyšší produkce sekundárních metabolitů po elicitaci, zejména rutinu, byla naměřena především v kalusových kulturách.
- Nejvyšší obsah rutinu (0,169 mg/g DW) byl detekován v kalusové kultuře po 168 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = (3,6057 \times 10^{-3} \text{ mol/l})$ .
- Maximální produkce hyperosidu (0,003 mg/g DW) byla naměřena u kalusové kultury po 6 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_2 = (3,6057 \times 10^{-4} \text{ mol/l})$ .
- Kalusové i suspenzní kultury uvolňovaly rutin i do svých médií.
- Nejvyšší obsah rutinu (3,36  $\mu\text{g/ml}$ ) byl naměřen v médiu suspenzní kultury po 72 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = (3,6057 \times 10^{-3} \text{ mol/l})$ .
- Hypericin nebyl detekován v žádné kalusové ani suspenzní kultuře a nedošlo ani k jeho uvolnění do živných médií těchto kultur.

Z následujících výsledků vyplývá, že abiotický elicitor, zkratkou EM17, může mít za specifických podmínek pozitivní vliv na produkci sekundárních metabolitů v kalusových kulturách *Hypericum perforatum L.*, hlavně po 168 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = (3,6057 \times 10^{-3} \text{ mol/l})$ .

## 9. LITERATURA

1. Namdeo A. G., et al. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev.* 2007; 1(1), 69-79.
2. Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1. přeprac. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého 1995; 1-82.
3. [http://www.biolib.de/thome3/screen/IMG\\_7752.jpg](http://www.biolib.de/thome3/screen/IMG_7752.jpg) (19.2.2020)
4. <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/trezalka-teckovana-kviti-svateho-jana-271471> (10.10.2019)
5. <http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=958> (citováno 10.10.2019)
6. Kolektiv autorů. Český lékopis 20017, 4. díl 1. vyd. Praha: Grada 2017; 4073.
7. Jahodář L. Léčivé rostliny v současné medicíně (co Mattioli ještě nevěděl). Praha: Havlíček Brain Team 2010; 143-144.
8. Opletal L., Volák J. Rostliny pro zdraví. Praha: Aventinum nakladatelství, s. r. o. 1999; 96-97.
9. <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html> (citováno 19.2.2020)
10. Patočka J., Strunecká A. Standardizovaný extrakt třezalky tečkované: Nové rostlinné antidepresivum. *Vojenské zdravotnické listy.* 2003; 72(3), 114–118.
11. Klemow K. M., Bartlow A., Crawford J. et al. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Biomolecular and Clinical Aspects.* 2011; 11.
12. Barras A., Boussekey L., Courtade E. et al. Hypericin-loaded lipid nanocapsules for photodynamic cancer therapy in vitro. *Nanoscale.* 2013; 5(21), 10562-10572.
13. Galeotti N., Farzad M., Bianchi E. et al. PKC-mediated potentiation of morphine analgesia by St. John's Wort in rodents and humans. *Journal of pharmacology Science.* 2014; 124(4), 409-17.
14. Pia S. Bl., Verotta L., Rosato A. et al. Anticancer and antibacterial activity of hyperforin and its derivatives. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 2014; 14(10), 1397-1401.
15. Arndt S., Haag S. F., Kleemann A. et al. Radical protection in the visible and in frared by a hyperforin-rich cream *in vivo* versus *ex vivo* methods. *Experimental dermatology.* 2013; 22(5), 354-357.
16. Navrátilová Z. Antidepresiva přírodního původu. *Praktické lékařství.* 2011; 7(4), 191-194.
17. Tůmová L., Bajerová J. *Hypericum perforatum* interakce s ostatními léky. *Praktické lékařství I.* 2006; 28-30.

- 18.** Wöfle U., Seelinger G., Schempp Ch. M. Topical application of St. John's wort. *Planta Medica*. 2014; 80, 109-120.
- 19.** Nostratabadi R., Rastin M., Sankian M. et al. M. St. John's wort and its component hyperforin alleviate experimental autoimmune encephalomyelitis through expansion of regulatory T-cells. *Journal of immunotoxicology*. 2016; 13(3), 364-374.
- 20.** Yechiam E., Ben E. D., Ashby N. J. S. et al. The acute effect of *Hypericum perforatum* on short-term memory in healthy adults. *Psychopharmacology*. 2019; 236(2), 613-623.
- 21.** Valletta E., Rinaldi A., Marini M. et al. Distinct *Hypericum perforatum* L. total extracts exert different antitumour activity on erythroleukemic K562 cells. *Phytotherapy research*. 2018; 32(9), 1803-1811.
- 22.** You M. K., Kim H. J., Kook J. H. et al. St. John's Wort Regulates Proliferation and Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Inhibiting AMPK/mTOR and Activating the Mitochondrial pathway. *Journal List*. 2018; 19(4), 966.
- 23.** Khadem N. S., Taghavi Z. A., Aghazadeh M. et al. Strong antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. against oral isolates of *Lactobacillus* spp. *Cell Molecular Biologie*. 2017; 63(11), 58-62.
- 24.** Li Y., Wang Y., Li L. et al. Hyperoside induces apoptosis and inhibits growth in pancreatic cancer via Bcl-2 family and NF- $\kappa$ B signaling pathway both *in vitro* and *in vivo*. *Tumor Biology*. 2016; 37(6), 7345-7355.
- 25.** Kim, Y., Narayanan S., Chang K. O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral research*. 2010; 88(2), 227-235.
- 26.** Olga E. F., Sekine S., Shitara Y. et al. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions: Insight into Mechanisms and Consequences. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2016; 41(2), 93-108.
- 27.** Borelli F., Izzo A. A. Herb-drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *The AAPS Journal*. 2009; 11(4), 710-727.
- 28.** Soleymani S., Bahramsoltani R., Rahimi R. et al. Clinical risks of St John's Wort (*Hypericum perforatum*) co-administration. *Expert Opinion on Drug Metabolism a Toxicology*. 2017; 1047-1062.
- 29.** Zhou S., Chan E., Pan S.Q. et al. Pharmacokinetic Interactions of drugs with St John's wort. *Journal of Psychopharmacology*. 2004; 18(2), 262-276.
- 30.** Berry-Bibee E. N., Kim M. J., Tepper N. K. et al. Co-administration of St. John's wort and hormonal contraceptives: a systematic review. *Contraception*. 2016; 94(6), 668-677.

- 31.** Lei H. P., Yu X. Y., Xie H. T. et al. Effect of St. John's wort supplementation on the pharmacokinetics of bupropion in healthy male Chinese volunteers. *Xenobiotika*. 2010; 40(4), 275-281.
- 32.** Uygur B. O., Kalkay M. N., Oskay B. E. et al. St. John's wort (*Hypericum perforatum*) and warfarin: Dangerous liaisons! *Turkish Journal of Gastroenterology*. 2011; 22(1), 115.
- 33.** Stevinson C., Ernst E. Hypericum for depression: an update of the clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology*. 1999; 9(6), 501-505.
- 34.** Hoban C. L., Byard R. W., Musgrave I. F. A comparison of patterns of spontaneous adverse drug reaction reporting with St. John's wort and fluoxetine during the period 2000-2013. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2015; 42(7), 747-751.
- 35.** Tůmová L., Holcová L. Přehled účinků a bezpečnosti užívání drog v průběhu těhotenství a laktace – 5. část. *Praktické lékárenství*. 2016; 12(4), 138-142.
- 36.** <http://patient.info/doctor/st-johns-wort> (citováno 10.10. 2019)
- 37.** Ferrara M., Mungai F., Starace F. St John's wort (*Hypericum perforatum*)-induced psychosis: a case report. *Journal of medical case report*. 2017; 11(1), 137.
- 38.** Martin J., Martinová D. Léčivé rostliny s hypnotickým a sedativním účinkem. *Praktické lékárenství*. 2014; 10(6), 226-228.
- 39.** Ditrichová D. Fotosenzitivní potenciál léčiv pro zevní i celkové použití. *Medicína Pro Praxi*. 2008; 5(10), 385-387.
- 40.** Stage T. B., Damkier P., Christensen M. M. et al. Impaired Glucose Tolerance in Healthy Men Treated with St. John's Wort. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2016; 118(3), 219-224.
- 41.** [http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika\\_fr/mb130c14/navody/11\\_invitro.pdf](http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c14/navody/11_invitro.pdf) (citováno 17.11.2019)
- 42.** Sikyta B., Dušek J. *Biotechnologie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum 2001; 24, 75–83.
- 43.** George E. F., Hall M. A., De K. G-J. *Plant tissue culture procedure-background*. Dordrecht: Springer 2008; 1-28.
- 44.** Procházka S., Šebánek J. *Regulátory rostlinného růstu*. Praha: Academia 1997; 149-63.
- 45.** [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2011/Bi6120/um/06\\_Kalusy\\_2011.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2011/Bi6120/um/06_Kalusy_2011.pdf) (citováno 7.2.2020)
- 46.** <https://www.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-praktikum-2> (citováno 1.3.2020)
- 47.** Saad A. I. M., Elshahed A. M. Plant Tissue Culture Media. In: Leva A. ed.: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. Winchester: InTech 2012, 29–40.

- 48.** [http://botany.upol.cz/pagedata\\_cz/vyukove-materialy/87\\_teksb-2011-2012-www.pdf](http://botany.upol.cz/pagedata_cz/vyukove-materialy/87_teksb-2011-2012-www.pdf) (citováno 7.2.2020)
- 49.** [http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika\\_fr/mb130c74/navody/10\\_fytohormony.pdf](http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c74/navody/10_fytohormony.pdf) (citováno 8.2.2020)
- 50.** Dubová J., Smíšková A. Od rostlinné kultury "in vitro" k biotechnologiím. <https://educoland.muni.cz/dotn-50/> (citováno 22.2.2020).
- 51.** Kamenická A., Rypák M. Explantáty v rozmnožování dřevín. 1. vyd. Bratislava: Veda 1989; 10, 20-47.
- 52.** Sikyta B., Dušek J. Biotechnologie pro farmaceuty. 1. vyd. Praha: Karolinum 1992, 90-94.
- 53.** Procházka S., Macháčková I., Krekule J. Fyziologie rostlin. Academia Praha 1998; 240-285, 322-346, 412-431.
- 54.** Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2014; 2, 53.
- 55.** Naik P. M., Al-Khayri J. M. Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites productions through *in vitro* culture of medicinal plants in: Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives. 2016; 247-277.
- 56.** Vasconsuelo A., Boland, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 2007; 172(5), 861-875.
- 57.** Doležal M. Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu. *Chemické listy*. 2006; 100, 959-966.
- 58.** Doležal M., Králová K. Synthesis and Evaluation of Pyrazine Derivates with Herbicidal Activity. *Herbicides, Theory and Applications*. 2011, 581-610.
- 59.** Bouz G., Juhás M., Niklová P. et al. Ureidopyrazine Derivates: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-infectiives and Abiotic Elicitors. *Molecules*. 2017; 22, 1797.
- 60.** Tůmová L., Tůma J., Kubeš J. et al. New Synthetic Pyrazine Carboxamide Derivates as Potential Elicitors in Production of Secondary Metabolite *in vitro* cultures. *Pharmacognosy Magazine*. 2016; 12, 57-62.
- 61.** Doležal M. Ústní sdělení. Katedra farmaceutické chemie a analýzy, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové. (citováno 1.3.2020)
- 62.** Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Journal of Plant Physiology*. 1962; 15, 473-497.
- 63.** Klemra P., Klemrová V. Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. 3. vyd. Praha: Karolinum 1999; 15-16, 23-27.

- 64.** Reisenauer R. Metody matematické statistiky a jejich aplikace. 2. rev. a dopln. vyd. Praha: SNTL 1970; 26-33, 78-81.
- 65.** Sojková K. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních látek v in vitro kulturách léčivých rostlin. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2014.
- 66.** Majerová V. *Hypericum perforatum* in vitro – abiotická elicitace. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2015.
- 67.** Slavík M. Kultury léčivých rostlin in vitro- XV. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2016.

## 10. ABSTRAKT

Předmětem této diplomové práce bylo sledovat, zda abiotický elicitor 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid má vliv na produkci sekundárních metabolitů v kalusových a suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L. Kultivace probíhala za použití živného média dle Murashigeho a Skooga (MS) obohaceného o růstový regulátor kyselinu  $\alpha$ -naftyloctovou o koncentraci 1 mg/l.

Elicitor byl ke kulturám přidáván ve třech koncentracích:  $c_1 = 100,0$  mg/100 ml;  $c_2 = 10,0$  mg/100 ml;  $c_3 = 1,00$  mg/100 ml. Jednotlivé vzorky se odebíraly po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách působení elicitoru. Kontrolní vzorky bez přítomnosti elicitoru se odebíraly po 6, 48 a 168 hodinách. Odebrané vzorky se usušily a následně zpracovaly do metanolových výluhů pro stanovení obsahu sekundárních metabolitů (rutinu, hyperosidu a kvercetin) pomocí HPLC analýzy. Bylo sledováno i uvolňování těchto metabolitů do živných médií.

Elicitací byla ovlivněna produkce sekundárních metabolitů hlavně v kalusových kulturách, kde bylo naměřeno několik statisticky významných hodnot nárůstu jejich produkce. Nejvyšší obsah rutinu (0,169 mg/g DW) byl naměřen v kalusové kultuře po 168 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = (3,6057 \times 10^{-3}$  mol/l). Vyšší obsah hyperosidu byl naměřen u kalusové kultury po 6 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_2 = (3,6057 \times 10^{-4}$  mol/l). Produkce sekundárních metabolitů v suspenzních kulturách byla ve srovnání s kalusovými kulturami nízká.

Suspenzní i kalusové kultury uvolňovaly rutin i do svých médií. Kvercetin se uvolnil pouze do jednoho kalusového média po 24 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = (3,6057 \times 10^{-3}$  mol/l). Nejvyšší obsah (3,36  $\mu$ g/ml) rutinu byl naměřen v suspenzním médiu po 72 hodinách působení elicitoru v koncentraci  $c_1 = (3,6057 \times 10^{-3}$  mol/l).

Elicitor 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid pouze v některých případech významně ovlivnil produkci sekundárních metabolitů v kalusových kulturách *Hypericum perforatum* L.

## 11. ABSTRAKT

The main purpose of the theses was to find if the abiotic elicitor 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazine-2-yl)benzenesulfonamide has any influence on the secondary metabolites production in callus and suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. The cultivation was taking place in the Murashige a Skoog (MS) nutrient medium enriched by the growth regulator - alpha-naphthyl acetic acid at the concentration of 1 mg.L<sup>-1</sup>.

The elicitor was added to the cultures at the three levels of concentration:  $c_1= 100.0$  mg/100 ml;  $c_2= 10.0$  mg/100 ml;  $c_3= 1.00$  mg/100 ml. The individual samples were taken after 6, 24, 48, 72 and 168 hours of the elicitor application. The control samples without the elicitor were taken after 6, 48 and 168 hours. The collected samples were dried and subsequently transformed into methanol extracts in order to determine secondary metabolites content (rutin, hyperoside and quercetin) by HPLC method. Release of these metabolites into nutrient media was also subject of this observation.

The elicitation has influenced production of the secondary metabolites, particularly in callus cultures, wherein several statistically significant values, characterizing increase in their production, were measured. The highest content of rutin (0.169 mg.g<sup>-1</sup> DW) was determined in callus culture after 168 hours when the elicitor was applied at the concentration of  $c_1= (3.6057 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1})$ . The higher content of hyperoside was found in callus culture after 6 hours when the elicitor was used at the concentration of  $c_2= (3.6057 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1})$ . In comparison with callus cultures, production of the secondary metabolites in suspension cultures was lower.

Suspension and callus cultures released rutin also into their own media. Quercetin was released only into one callus medium after 24 hours when the elicitor was applied at the concentration of  $c_1= (3.6057 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1})$ . The highest content of rutin (3.36 µg.mL<sup>-1</sup>) was measured in suspension medium after 72 hours when the elicitor was used at the concentration of  $c_1= (3.6057 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1})$ .

Only in some cases, the elicitor 2,4,6-trimethyl-N-(pyrazine-2-yl)benzenesulfonamide influenced the production of the secondary metabolites in callus cultures of *Hypericum perforatum* L. significantly.