

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Produkce fenylpropanoidů v rostlinné explantátové kultuře

Mgr. Jana Křepelová

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Konzultant rigorózní práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Oponent: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Úvodem bych chtěla poděkovat PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí literárních podkladů a také cenných rad a připomínek. Zároveň děkuji za trpělivost a čas, který mi při vypracování mé rigorózní práce věnovala.

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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

.....
Jana Křepelová

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. Fenylypropanoidy	9
3.1.1. Charakteristika	9
3.1.2. Biosyntéza fenylypropanoidů	10
3.1.3. Enzymy biosyntézy fenylypropanoidů	12
3.1.3.1. Fenylyalaninamoniumlyáza (PAL)	12
3.1.3.1.1. Aktivita PAL při obranných reakcích rostlin	14
3.1.3.2. Cinamát 4-hydroxyláza	15
3.1.3.3. 4-kumarát-CoA ligáza	16
3.2. Prekurzory biosyntézy fenylypropanoidů	17
3.2.1. Obecná charakteristika	17
3.2.2. Aromatické aminokyseliny	17
3.2.2.1. Biosyntéza aromatických aminokyselin	18
3.2.2.2. Geny kódující enzymy biosyntézy	19
3.2.2.3. Enzymy šikimátové dráhy	19
3.2.3. Fenylyalanin	22
3.2.3.1. Biosyntéza fenylyalaninu	23
3.2.4. Kyselina skořicová	26
3.3. Explantátové kultury	28
3.3.1. Sekundární metabolity	28
3.3.2. Kultury <i>in vitro</i>	29
3.4. Jetele luční (<i>Trifolium pratense</i> L., <i>Fabaceae</i>)	32
3.4.1. Významné účinky isoflavonů jetele lučního	33
3.4.2. Potenciální léčebné účinky méně známých druhů jetele	36

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky	38
4.1.1. Rostlinný materiál	38
4.1.2. Stanovení ztráty sušením.....	38
4.1.3. Chemikálie	38
4.1.4. Přístroje a pomůcky.....	39
4.2. Kultivace explantátové kultury	40
4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje.....	40
4.2.2. Příprava živného média	40
4.2.3. Pasážování a kultivace	42
4.3. Aplikace prekurzorů biosyntézy fenylpropanoidů.....	42
4.3.1. Příprava vzorků prekurzorů.....	42
4.3.2. Aplikace prekurzorů a odběr kultur.....	42
4.4. Stanovení obsahu flavonoidů.....	43
4.4.1. Princip stanovení	43
4.4.2. Postup stanovení.....	43
4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů	45
4.5.1. Příprava vzorku	45
4.5.2. Parametry HPLC analýzy.....	45
4.6. Statistické vyhodnocení.....	46
5. VÝSLEDKY	49
5.1. Tabulky.....	49
5.2. Grafy.....	53
6. DISKUZE.....	58
7. ZÁVĚR.....	62
8. SEZNAM LITERATURY	63
9. ABSTRAKT	67

1. ÚVOD

Velkou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů pozoruhodných svojí bohatou strukturní variabilitou a širokým rozsahem biologických účinků tvoří fenylypropanoidy. K jejich významným zástupcům patří flavonoidy a isoflavonoidy, což jsou zároveň důležité obsahové látky jetele lučního (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). [3,7]

Fenylypropanoidy jsou syntetizovány šikimátovou cestou za pomoci aromatických aminokyselin fenylyalaninu a tyrosinu. Základním klíčovým meziproduktem biosyntézy je kyselina skořicová nebo její deriváty. Nedávné studie přinesly nové pohledy na regulaci biosyntézy šikimátové dráhy, aromatických aminokyselin i celé řady rozmanitých sekundárních metabolitů z nich odvozených. Zároveň byla identifikována řada transkripčních faktorů regulujících expresi genů kódujících enzymy biosyntézy, které jsou předmětem dalších výzkumů. [3,16]

K produkci sekundárních metabolitů se po dlouhou dobu využívalo polní pěstování bylin. Vzhledem k obtížím při zajišťování přírodních surovin vedly snahy k hledání alternativních způsobů produkce odpovídajících sekundárních metabolitů prostřednictvím biotechnologického pěstování kultur *in vitro*. [30]

Možnosti využívání rostlinných explantátů k produkci léčivých látek jsou však zatím omezené. Zkoumají se cesty ovlivnění této produkce využitím prekurzorů požadovaných metabolitů, biotransformací nebo procesem elicítace kultur. [7]

V porovnání s diferencovanou rostlinou se osvědčily buněčné kultury *in vitro* jako ideální systém ke studiu biosyntézy přírodních látek na enzymové úrovni. V kulturách se do biosyntézy ve většině případů zapojují a řídí ji stejné signály jako v intaktní rostlině.

Neustále se také studují a vylepšují procesy bioreaktorových studií k využití produkce sekundárních metabolitů z kultur rostlinných buněk a hledají se nové možnosti zlepšení průmyslového využití. [30]

Stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto látek. V poslední době se objevuje množství přípravků s obsahem isoflavonoidů jetele lučního, které jsou doporučovány ženám na odstranění či zmírnění klimakterických obtíží. Mnohé studie se proto snaží potvrdit toto příznivé působení na postmenopauzální potíže, jejich výsledky ale nejsou jednotné. Současné výzkumy prověřují i další významné účinky isoflavonů jetele lučního. Značnému vědeckému zájmu podléhají také potenciální léčebné účinky dalších druhů *Trifolium*. [7,32]

2. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo sledovat ovlivnění produkce kalusové a suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. prekurzory biosyntézy fenylypropanoidů (aplikace fenylalaninu a kyseliny skořicové).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Fenylypropanoidy

3.1.1. Charakteristika

Fenylypropanoidy neboli deriváty fenylypropanu tvoří významnou podskupinu přírodních aromatických látek. Jsou to sloučeniny, které obsahují na aromatickém jádře navázaný tříuhlíkatý řetězec. Jsou syntetizovány nejčastěji šikimátovou cestou za pomoci aminokyselin fenylyalaninu a tyrosinu. C₆ + C₃ konstrukce vyplývá z cesty počáteční deaminace primárního metabolitu fenylyalaninu. [1,2]

Fenylypropanoidy tvoří velkou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů, pozoruhodných svojí bohatou strukturní variabilitou a velmi širokým rozsahem biologických funkcí a účinků jak v rostlině samotné, tak i v působení na jiné organizmy. Chemická rozmanitost fenylypropanoidů není náhodná. Je výsledkem specificky vyvinutých a řízených biogenetických drah, které se promítají do příslušných rostlinných metabolizmů. [3,4]

Různorodost derivátů odvozených z počáteční fenylypropanoidní struktury všudypřítomné v rostlinách slouží k zásadním vývojovým rolím v rostlinné strukturální integritě, např. UV fotoprotekci, reprodukci, vnitřní regulaci fyziologických funkcí rostlinné buňky a signalizaci. Fenylypropanoidy jsou také klíčovými chemickými modulátory rostlinné komunikace s hmyzem a mikroby. [1]

K nejpočetnějším a zároveň i nejvýznamnějším zástupcům fenylypropanoidů patří lignany, flavonoidy, kumariny, rotenoidy a stilbeny. [3]

Produkce flavonoidů, kumarinů a strukturních komponent typu ligninu a suberinu může být ovlivněna následkem stresové reakce při obraně rostlin, jedná se tedy o fytoalexiny. [3]

Rostliny jsou během růstu vystaveny různým druhům poškození vyvolaným stresem, které vedou k porušení rostlinné tkáně nebo k morfologickým změnám v jejich stavbě. Proto si ve snaze eliminovat tyto stresové vlivy vytvořily komplexní mechanismus obrany, chránící je proti infekci nebo mechanickému poškození. Jedním z těchto mechanismů je produkce fenylypropanoidních látek. Na počátku syntézy těchto látek se nachází enzym fenylylalaninamoniolyáza, jehož aktivita je ukazatelem obranyschopnosti rostliny vůči stresu. [6] Roli tohoto enzymu ve vztahu k poranění rostlin se bude více věnovat kapitola 3.1.3.1. Fenylylalaninamoniolyáza (PAL).

Problematikou obranných reakcí rostlin, fytoalexinů, flavonoidů a isoflavonoidů jsem se zabývala v diplomové práci. [7]

3.1.2. Biosyntéza fenylypropanoidů

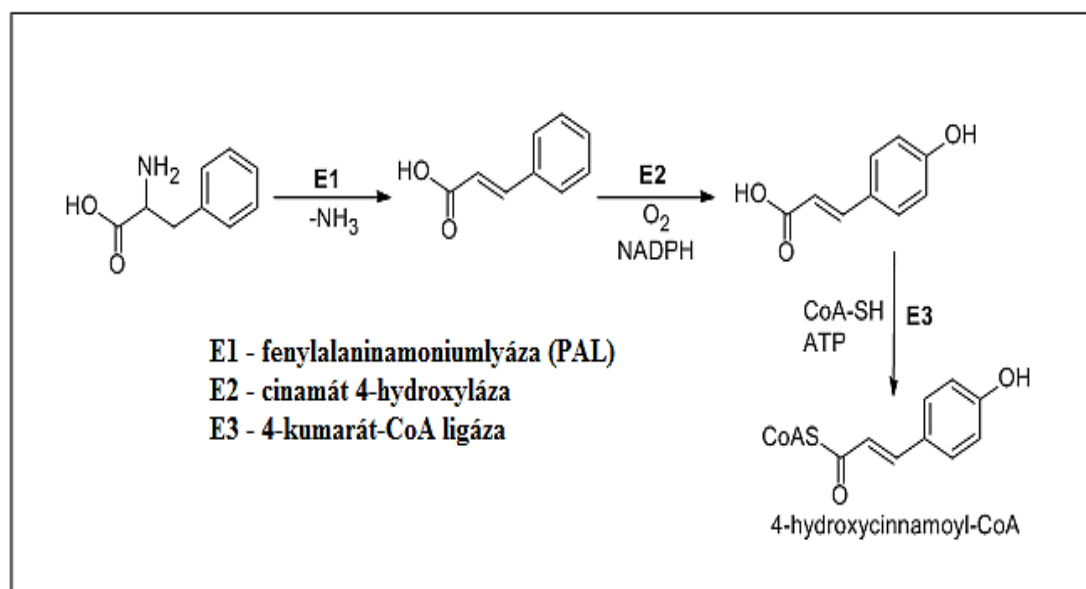
Biosyntéza fenolických obsahových látek rostlin vychází ve většině případů z aromatických aminokyselin. U hub a prokaryontů je významnější cesta výstavby aromátů z acetátových jednotek, což u vyšších rostlin probíhá jen minimálně.

Metabolismus aromatických sloučenin lze jen v omezené míře počítat k obecným schopnostem rostlin. Tyto reakční pochody probíhají v rozsáhlých úsecích ve vysoce specifické vazbě na rostlinné rody a druhy. Pro biosyntézu mnohých sloučenin, které se odvozují od fenylypropanových látek, je k dispozici většinou více reakčních cest. [8]

U většiny rostlinných druhů využívajících obecnou fenylypropanoidní cestu biosyntézy jsou popsány tři základní enzymatické transformace přeměňující tok uhlíku z primárního metabolismu a transformující fenylylalanin na koenzym A (CoA) - aktivovaný hydroxycinnamoyl thioester. Ten je schopný vstupovat do dvou významnějších cest biosyntézy: monolignolů a flavonoidů. [5]

Deaminace fenylalaninamoniumlyázou (PAL) tvoří fenylpropanoidní jádro, produktem je kyselina skořicová. Cinamát 4-hydroxyláza (C4H) katalyzuje uvedení hydroxylové skupiny do *para* postavení aromatického kruhu kyseliny skořicové. Vzniká tak kyselina *p*-kumarová. Karboxylová skupina kyseliny *p*-kumarové je následně aktivovaná utvářením thioesterového komplexu s koenzymem A (CoA). Tento proces je katalyzován enzymem *p*-kumaroyl-CoA ligázou (4CL) (Obr 1).

Významné traviny, některé druhy hub a bakterie využívají tyrosinamoniumlyázu (TAL). Tento enzym přímo používá tyrosin jako substrát. Redukuje tímto počet enzymů nutných pro produkci *p*-kumaroyl-CoA, ze tří hlavních enzymů pouze na dva. [5,9]



Obrázek 1: Schéma základních kroků biosyntézy fenylpropanoidů. [10]

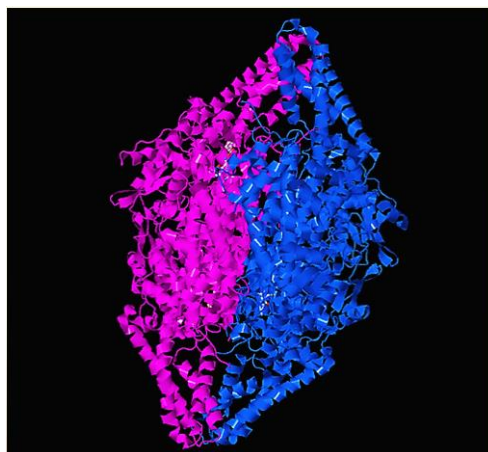
3.1.3. Enzymy biosyntézy fenylpropanoidů

3.1.3.1. Fenylalaninamoniumlyáza (PAL)

Enzym zodpovědný za aktivaci prvního kroku biosyntézy fenylpropanoidních látek se nazývá fenylalaninamoniumlyáza (PAL). Jedná se o enzym katalyzující neoxidativní deaminaci fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu a amoniak. [6]

Již v roce 1961 autoři Koukol, Conn a Neish byli schopni příslušně ukázat, že fenylalanin může být převedený na *trans*-cinamát a tyrosin na *trans-p*-kumarát se ztrátou amoniaku. Enzym zodpovědný za tuto klamně jednoduchou reakci je nyní známý pod názvem PAL. [11]

Kvůli své klíčové roli v sekundárním metabolismu fenylpropanoidů byl PAL značně studovaný. Je to také jediný hlavní enzym cesty biosyntézy fenylpropanoidů, pro který jsou k dispozici detailní strukturně-funkční informace. První struktury bakteriální a rostlinné PAL byly rozluštny v roce 2004. Další bakteriální a houbové PAL/TAL struktury byly objasněny až později. [5]



Obrázek 2: Krystalová struktura fenylalaninmoniumlyázy (PAL). [12]

Mechanismus PAL je obdobou mechanismu enzymu histidinamoniumlyázy (HAL) pocházejícího z hlavní degrační cesty distribuovaného histidinu. [5]

Skupina L-aminokyselinamoniumlyáz katalyzuje odštěpení protonu z β uhlíku a následné odštěpení aminoskupiny z aminokyseliny. Enzymy obsahují jako kofaktor 3,5-dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-on (MIO), který se tvoří cyklizací a dehydratací sekvence tří konzervovaných aminokyselin (Ala-Ser-Gly). MIO je silně elektrofilní. [6,13]

V prvním kroku reaguje methylidenová skupina MIO s aminoskupinou substrátu za tvorby aduktu. Pozitivní náboj na dusíku a schopnost aromatického vedlejšího řetězce substrátu přitahovat elektrony vede k aktivaci C3 fenylalaninu pro deprotonizaci bázi z aktivního místa PAL za tvorby karbanionu. Vazba mezi C2 substrátu a aminoskupinou se rozštěpí, jedním z hlavních produktů je kyselina skořicová. Komplex MIO-NH₂ je protonizován kyselou skupinou v aktivním místě PAL za odštěpení NH₃ a regenerace MIO. [6]

Enzym PAL se nejvíce vyskytuje u vyšších rostlin, dále u některých hub a prokaryotních organizmů. V živočišných tkáních není přítomný. [6]

V závislosti na biologickém zdroji může PAL katalyzovat s větší či menší účinností také reakci s tyrosinem jako substrátem. U dvouděložných rostlin je PAL vysoce specifická pro fenylalanin. U některých druhů fotosyntetických bakterií upřednostňuje PAL jako substrát tyrosin za vzniku *p*-hydroxyskořicové kyseliny. U jednoděložných rostlin katalyzuje přeměnu tyrosinu i fenylalaninu se stejnou účinností. [6]

Studium PAL, enzymu významného pro aktivaci prvního kroku biosyntézy fenylpropanoidů a dalších významných přírodních látek, je v současné době středem výzkumného zájmu také v souvislosti s obrannými reakcemi rostlin. [6]

3.1.3.1.1. Aktivita PAL při obranných reakcích rostlin

Při poranění rostlin dochází vlivem změn v rostlinné tkáni k indukci promotoru fenylalaninamoniumlyázy (PAL), který spouští akumulaci PAL mRNA a výsledně se zvyšuje aktivita tohoto enzymu. Na ovlivnění koncentrace PAL se podílí také hloubka a velikost poranění, šíření signalů a akumulace látek zahrnutých v sekundárních procesech. V místě poranění enzymy polyfenoloxidáza a peroxidáza způsobují oxidaci polyfenolických látek, což se projevuje zhnědnutím rostlinné tkáně. Zvýšená koncentrace PAL v rostlinách je odezvou nejen na poranění, ale i na infekci, případně teplotní změny, UV záření, radiaci apod. [6]

U některých rostlinných druhů byla popsána souvislost mezi aktivitou PAL a vzdáleností od místa poranění. V okolí místa působení stresového faktoru je možné očekávat účast signálních molekul, které se podílejí na indukci aktivity PAL v rostlinných tkáních. Jako signální molekuly mohou sloužit látky jako kyselina salicylová, abscisová, jasmonová a její methylester – methyljasmonát. Například kyselina jasmonová a methyljasmonát zvyšují produkci PAL mRNA a následně aktivitu PAL u buněčných kultur sojových bobů a také indukují akumulaci sekundárních metabolitů: *N*-substituované amidy hydroxyskořicové kyseliny (HCA). Strukturně se jedná o polyaminy kovalentně vázané na hydroxyskořicové kyseliny (např. kyselinu kumarovou a kávovou). Po infekci patogeny bylo pozorováno zvýšení koncentrace HCA. Tyto signální molekuly vyvolaly zvýšení aktivity PAL u mladé listové tkáně, ale u starších listů k těmto změnám nedošlo. [6]

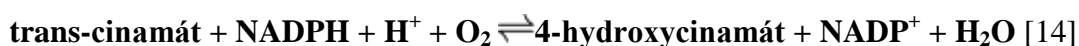
Svou roli může mít PAL také při vzniku systémové odolnosti po napadení rostliny patogenem. Systémová rezistence je aktivována lokálními nekrotizacemi způsobenými houbovou, bakteriální nebo virovou infekcí. Pro její vytvoření je pravděpodobně důležité nahromadění kyseliny salicylové. Enzym PAL katalyzuje první krok její biosyntézy, přeměnu fenylalaninu na kyselinu *trans*-skořicovou. Exprese genu *nahG* v rostlinách se podílí na zvýšené citlivosti k onemocnění. Vlivem kyseliny salicylové nebo jejího funkčního analogu kyseliny

2,6-dichlorisonikotinové se může citlivost změnit v odolnost. Mechanismus indukce rezistence prostřednictvím kyseliny salicylové není ještě zcela objasněn. [6]

3.1.3.2. Cinamát 4-hydroxyláza

Dalším krokem biosyntézy po vytvoření cinamátu z fenylalaninu v hlavní sekvenci je *para* hydroxylace. Druhý enzym této cesty biosyntézy je členem všudypřítomného mikrozomálního enzymu skupiny oxygenáz známých jako Cytochrom P-450. Takto pojmenovaný je kvůli vlastnosti absorpce (při 450 nm) jejich katalického železa - obsahující hem kofaktory. [5,11]

Reakce probíhá dle následujícího schématu. Substráty vstupující do této reakce jsou: *trans*-cinamát, NADPH, H⁺ a O₂. Produkty jsou: 4-hydroxycinamát, NADP⁺ a H₂O. [14]



Cytochrom P-450 monooxygenázy hrají důležitou roli v hlavních cestách metabolismu fenylpropanoidů. Přesto doposud nebyla žádná rostlinná P-450 monooxygenáza strukturálně charakterizovaná. [5]

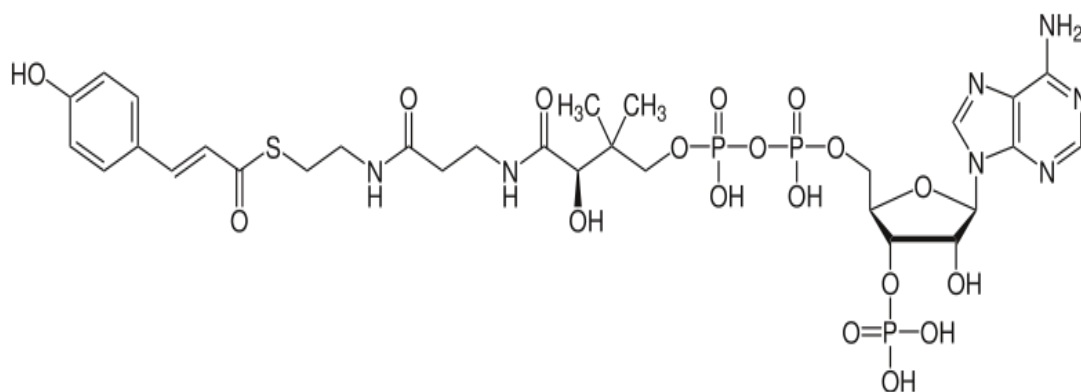
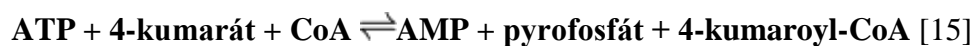
Strukturální objasnění podobného savčího jaterního P-450 systému bylo usnadněné využitím mutací a delecí v primární sekvenci vedené homologie k počáteční krystalové struktuře rozřešeného bakteriálního P-450 systému. [5]

Homologie modelování rostlinných P-450 systémů založená na těchto příbuzných strukturách může poskytnout záchytné body. Co se týče funkční rozmanitosti rostlinných P-450 systémů obecně, podrobnější a předvídatelnější porozumění jejich rolí v cestách biosyntézy fenylpropanoidů očekává další biochemické zkoumání a strukturální objasnění. Zatímco nahrazení enzymu TAL za PAL dovoluje obejít tento počáteční nerozluštitelný P-450 enzym biosyntézy, následující kroky katalyzované P-450 systémem v monolignolové a flavonoidní cestě biosyntézy nelze tak snadno obejít. [5,9]

3.1.3.3. 4-kumarát-CoA ligáza

Konečným krokem hlavní fenylpropanoidní cesty biosyntézy je thioesterová aktivace. Tato reakce je katalyzovaná enzymem 4-kumarát-CoA ligázou. Je členem skupiny všudypřítomných AMP (adenosinmonofosfát) produkujících adenylujících enzymů (AAE). Tyto enzymy využívají adenylovaný meziproduct utvořený kondenzací AMP s karboxylovou skupinou - nosný malý molekulový substrát cestou ztráty pyrofosfátu z ATP (adenosintrifosfát). AMP je následovně uvolněný během kovalentního přenosu adenylovaného substrátu k napadení nukleofilního třetího substrátu, CoA nebo ekvivalentní fosfo- panteinové jednotky. Ačkoli zatím nebyla žádná krystalová struktura tohoto enzymu publikována, jsou známy některé související struktury skupiny enzymů AAE. Mezi nimi acyl a acetyl-CoA ligázy primárního metabolismu, ze kterých se rostlinné fenylpropanoid-CoA ligázy pravděpodobně vyvinuly. [5]

Obecně lze průběh této reakce shrnout do následujícího schématu. Tři substráty vstupující do reakce jsou: ATP, 4-kumarát, CoA. Vznikající produkty jsou: AMP, pyrofosfát, 4-kumaroyl-CoA. [15]



Obrázek 3: 4-kumaroyl-CoA [15]

3.2. Prekurzory biosyntézy fenylpropanoidů

3.2.1. Obecná charakteristika

Fenylpropanoidy jsou syntetizovány šikimátovou cestou za pomoci aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu. Šikimátová dráha produkuje největší počet jejich základních strukturních typů. Z těch pak dále vzniká obvykle jednoduchými enzymatickými transformacemi mnoho stovek až tisíců derivátů. Základním klíčovým meziproduktem biosyntézy je pak kyselina skořicová nebo její hydroxyderiváty: kyselina *p*-kumarová a kávová, či jejich methoxyderiváty: kyselina ferulová a sinapová. Z těchto klíčových látek vznikají další významné meziprodukty.[3]

3.2.2. Aromatické aminokyseliny

Aromatické aminokyseliny (AAA), fenylalanin (Phe), tyrosin (Tyr) a tryptophan (Trp), jsou ústřední molekuly v metabolismu rostlin. V rostlinách slouží nejen jako podstatné součásti syntézy proteinů, ale také jako prekurzory pro široký okruh sekundárních metabolitů důležitých pro růst rostlin i pro lidskou výživu a zdraví. [16]

Aromatické aminokyseliny nacházejí své uplatnění také v průmyslu při výrobě nízkokalorického sladidla aspartamu a monoaminových neurotransmiterů typu serotoninu, dopaminu (antiparkinsonikum - levodopa), adrenalinu a noradrenalinu, vyskytujících se v centrálním a periferním nervovém systému většiny druhů savců. [16]

3.2.2.1. Biosyntéza aromatických aminokyselin

V rostlinách a mikroorganismech se benzenové jádro může tvořit biosynteticky na rozdíl od lidského těla, pro které jsou tyto látky esenciální. Biosyntetická tvorba aromátů může probíhat dvojím způsobem:

- z cukerných zbytků metabolitů dráhou šikimátovou
- lineární kondenzací kyseliny octové, tzn. dráhou polyketidovou (acetogeninovou).

První cesta vede k aromatickým systémům s kyslíkovými funkcemi v *ortho*- a *para*-polohách, druhá cesta k *meta*-substitučním derivátům. Při biosyntéze některých látek s více aromatickými cykly se mohou uplatnit obě cesty. Např. 2- fenylchromony, od nichž jsou odvozeny flavony, anthokyany, katechiny atd. Obě biosyntetické cesty výstavby aromátů mají svoje společné základní etapy. Nejprve se vytváří základní skelet, který je pak následně modifikován, eventuálně transformován pomocí několika málo specifických enzymů do konečné podoby často velmi početných metabolitů, na tzv. metabolickou síť. [8]

Cesty biosyntézy AAA a jejich regulace byly značně prozkoumány v bakteriích (poprvé vysvětleno u *Escherichia coli*) pro jejich využitelnost v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. [8,16]

V rostlinách, bakteriích a houbách jsou aromatické aminokyseliny syntetizovány z prekurzoru metabolismu - chorismátu, který vzniká šikimátovou cestou biosyntézy. U bakterií je tato cesta AAA téměř výhradně užívaná pro syntézu bílkovin. V rostlinách AAA slouží také jako prekurzory pro různé druhy rostlinných hormonů (např. auxiny) a aromatických sekundárních metabolitů s rozmanitými biologickými funkcemi a biotechnologickou hodnotou. [16,17]

Přesto regulace a součinnost syntézy těchto aminokyselin není ještě zcela objasněna. Nedávné studie přináší nové pohledy na regulaci biosyntézy šikimátové dráhy, aromatických aminokyselin i celé řady rozmanitých sekundárních metabolitů z nich odvozených. Byla identifikována řada transkripčních faktorů regulujících

expresi genů kódujících tyto enzymy u *Arabidopsis* i jiných rostlinných druhů a je předmětem dalších výzkumů. [16]

3.2.2.2. Geny kódující enzymy biosyntézy

Geny kódující enzymy celé šikimátové dráhy byly identifikovány v rodu *Arabidopsis* a u dalších druhů rostlin především z důvodu jejich homologie s geny mikrobiálních organismů. [16]

Arabidopsis je rod z čeledi *Brassicaceae* podléhající velkému zájmu genetických výzkumů a molekulární biologie. Obsahuje rostlinu huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), jeden z modelových organismů používaných pro studium biologie rostlin, a první rostlinu mající sekvenován celý svůj genom. Rostlina slouží jako velmi užitečný model s dobře pozorovatelnými změnami. Má jeden z nejmenších genomů mezi rostlinami. [18,19]

Expozice rostlin různým stresům obecně indukuje expresi genů kódujících šikimátovou cestu a enzymy metabolismu aromatických aminokyselin. Bylo popsáno několik transkripčních faktorů (TFS) kódujících geny šikimátové cesty a biosyntézy aromatických aminokyselin. Například zvýšená exprese genu *AtMYB15* v *Arabidopsis* rostlinách zvyšuje expresi téměř ve všech genech zapojených do šikimátové dráhy, z čehož vyplývá, že se jedná o přímý regulátor této dráhy. [16]

Další příklady uvádím v následující kapitole týkající se příslušných enzymů šikimátové dráhy.

3.2.2.3. Enzymy šikimátové dráhy

Biosyntéza aromatického cyklu cestou kyseliny šikimové (název pochází z japonského šikimi-noki = badyáníku, *Illicium verum*) je typická zejména pro zelené rostliny, což patrně souvisí s tím, že fotosyntetická tvorba cukrů pro ně poskytuje dostatek výchozího materiálu – erytróza-4-fosfátu a fosfoenolpyruvátu. [8]

Šikimátová cesta biosyntézy zahrnuje **sedm reakcí katalyzovaných šesti enzymy** produkující **chorizmát**.

Fosfoenolpyruvát (PEP) a erytróza-4-fosfát (E-4P) jsou samostatně odvozeny z glykolýzy a neoxidační větve pentóza fosfátové cesty spojující šikimátovou cestu biosyntézy s centrálním uhlíkovým metabolismem. [16,20]

- První enzym šikimátové cesty **3-deoxy-D-arabino-heptulozonát-7-fosfát syntáza (DAHPS)** katalyzuje utváření 3-deoxy-d-arabino-heptulozonát-7-fosfátu z PEP a E-4P. Tento enzym vyžaduje pro svoji aktivitu Mn^{2+} a redukovaný thioredoxin (TRX). [16]

V *Arabidopsis* rostlinách je popsán gen DAHPS1 indukovaný fyzickým poraněním, methyl-jasmonátem, infiltrací patogenními kmeny *Pseudomonas* a dalšími faktory. [16,22]

- Druhý enzym je **3-dehydrochinát syntáza (DHQS)**, který katalyzuje utváření 3-dehydrochinátu. [16]
- Třetí a čtvrtý enzymatický krok katalyzuje bifunkční enzym **3-dehydrochinát dehydratáza (DHQ/SDH)/šikimát 5-dehydrogenáza (SDH)**, vedoucí k formaci šikimátu. [16]

Arabidopsis AtDHQ/SDH gen se ukázal být potřebný pro vývoj a funkci ženského gametofytu a zároveň propojení šikimátové cesty s rozmnožováním rostlin. [16,23]

- Enzym **šikimát kináza (SK)**, katalyzující pátou reakci šikimátové cesty, ATP-dependentní fosforylaci šikimátu na šikimát 3-fosfát. [16,21]

Různý počet izoform SK lze nalézt u několika druhů rostlin. Například jedna u zelených řas, plavuní, mechorostů a jedna až tři izoformy u jednoděložných a dvouděložných rostlin. [21]

Analýza proteinu SK u rostliny *Spinacia olerancea* odhalila jeho modulaci dle energetického stavu. Je tedy obdobou bakteriálních SK proteinů a jiných enzymů využívající ATP (adenosintrifosfát). [21]

- **Enolpyruvylšikimát 3-fosfát syntáza (EPSPS)** enzym, který katalyzuje vytvoření enolpyruvylšikimát 3-fosfátu (EPSP), katalyzuje další enzymatickou reakci. [16]

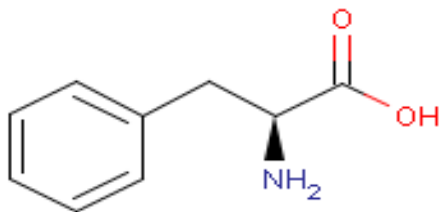
Exprese genu EPSPS může být indukována v reakci např. na infekci nekrotrofním houbovým patogenem *Botrytis cinerea*. Rostlinné EPSPS enzymy mohou být kompetitivně inhibovány herbicidem N-fosfonomethylglycinem (glyfosfát, analog fosfoenolpyruvátu), mající za následek snížení toku šikimátové cesty. [16,24]

- Poslední krok šikimátové cesty je katalyzován **chorizmát syntázou (CS)**, která přeměňuje EPSP na chorizmát. [16]

Reakce katalyzovaná enzymem CS vyžaduje flavin mononukleotid (FMN), který je donorem elektronů pro enolpyruvylšikimát 3-fosfát (EPSP), usnadňující štěpení fosfátu. Jeden až dva CS geny byly nalezeny u zelených řas, plavuní, mechorostů. Jeden až tři CS geny v genomech jabloní a jetelovin. [21]

Chorizmát je ústřední metabolit v rostlinných buňkách sloužící jako prekurzor pro syntézu aromatických aminokyselin (Phe, Try, Tyr). Také se uplatňuje jako iniciační substrát pro syntézu množství dalších metabolitů, jako např. tetrahydrofolátu, isochorizmatu v cestě k produkci salicylátu, fylloquinonu (vitamin K1) a různých pigmentů. [16]

3.2.3. Fenylalanin



Systematický název	(2S)-2-amino-3-fenylpropanová kyselina
Racionální název	L-2-amino-3-fenylpropionová kyselina
	L- α -amino- β -fenylpropionová kyselina
Triviální název	L-fenylalanin
Sumární vzorec	C ₉ H ₁₁ NO ₂

Obrázek 4: Struktura fenylalaninu [25]

Aromatická aminokyselina fenylalanin (Phe) se vyskytuje ve všech organizmech, zejména je podstatnou součástí bílkovin. V rostlinách slouží jako prekurzor pro velkou škálu různých funkčních sekundárních metabolitů, včetně fenylpropanoidů, flavonoidů, ligninů, antokyanů a mnoha dalších. [16]

Hlavní cesta biosyntézy Phe v rostlinách nastává prostřednictvím metabolitu arogenátu. Současné studie naznačují, že by rostliny mohly syntetizovat fenylalanin také prostřednictvím metabolitu fenylpyruvátu (PPY), podobně jako mnoho mikroorganismů. To je předmětem dalších výzkumů. [16,26] (Viz. následující kapitola 3.2.3.1 Biosyntéza fenylalaninu).

Lidské tělo si neumí fenylalanin syntetizovat, proto patří mezi esenciální bílkoviny, které musí přijímat v potravě. V lidském organismu patří mezi kódované esenciální (glukoplastické i ketoplastické aminokyseliny). V čistém stavu je to bílá krystalická látka. Je velmi důležitá jako sloučenina sloužící k tvorbě neurotransmiterů důležitých pro činnost nervové soustavy. [25]

Průmyslově se fenylalanin využívá k výrobě voňavek a k syntéze nízkokalorického umělého peptidového sladidla aspartamu (L-Asp-L-Phe-methylester). Je používán jako ochucovadlo potravin, konzervačních a antioxidačních přípravků. [25]

3.2.3.1. Biosyntéza fenylalaninu

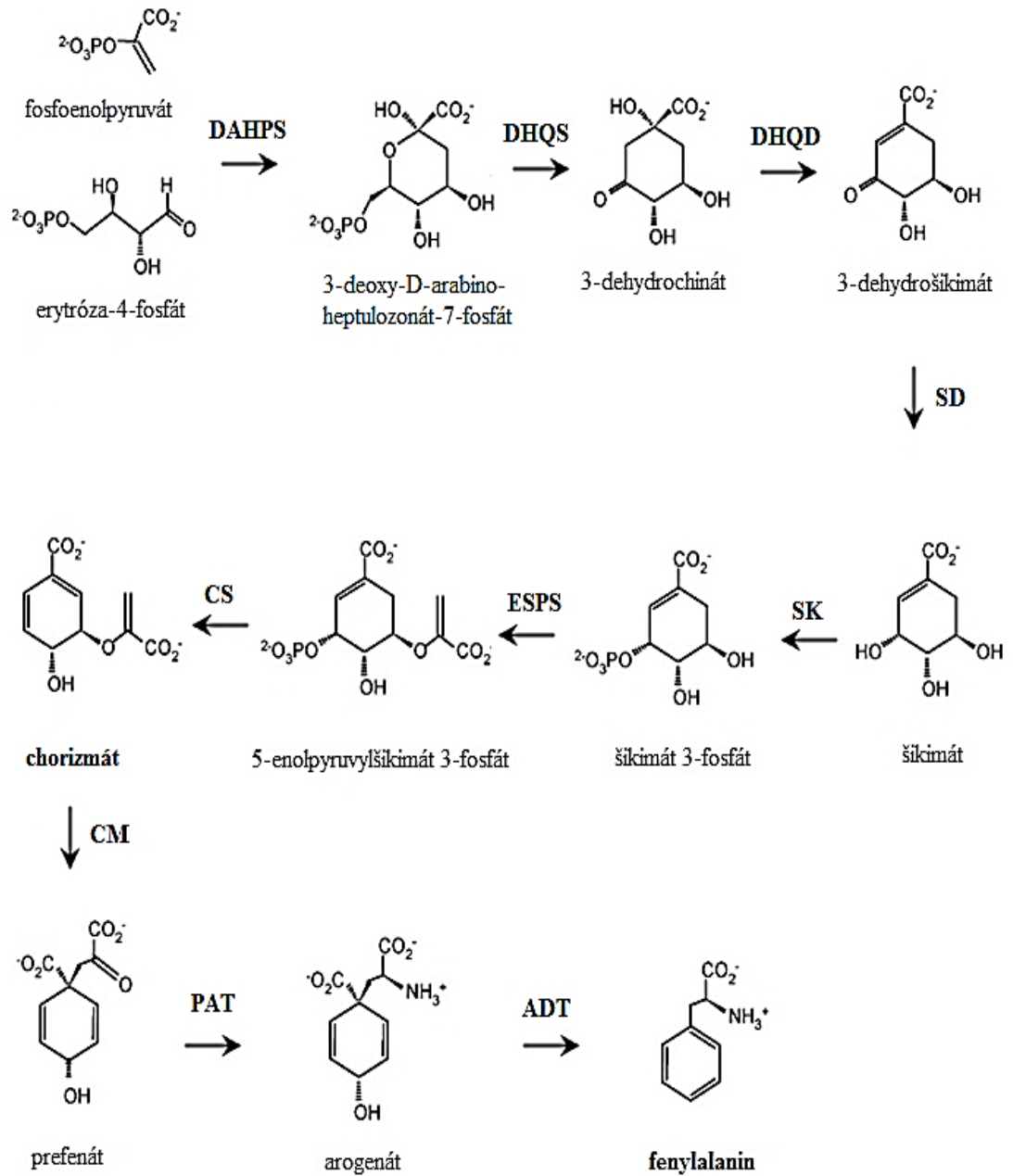
- První krok biosyntézy fenylalaninu z chorizmátu je katalyzovaný enzymem **chorizmat mutázou (CM)**, která přeměňuje chorizmat na prefenát.

Doposud byly popsány v *Arabidopsis* rostlinách tři CM geny (AtCM1-3). Tyto AtCM geny jsou odlišně vytvářeny v různých tkáních a pouze AtCM1 je indukovaný různými elicitory a patogeny. Aktivita AtCM1 a AtCM3 je inhibována aminokyselinami Phe a Tyr, zatímco AtCM2 se zdá být k těmto aromatickým aminokyselinám necitlivý. [16]

- Poslední dva enzymatické kroky převádějící prefenát na fenylalanin v rostlinách nejsou ještě zcela objasněny. Hlavní cesta biosyntézy zahrnuje konverzi chorizmátu přes prefenát a arogenát na fenylalanin katalyzované příslušnými enzymy **prefenát aminotransferáza (PAT)** a **arogenát dehydratáza (ADT)**. [16]

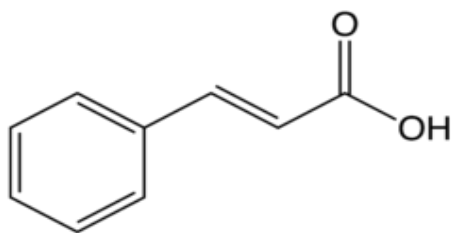
Zůstává sporné, zda rostliny mohou také přeměnit podobným způsobem jako u *Escherichia coli* a různých dalších mikroorganismů nějaké menší množství preferátu přes fenylpyruvát (PPY) na fenylalanin s využitím aktivity enzymů preferát dehydratáza (PDT) a fenylalanin aminotransferáza.

Ačkoli byla v rostlinách zaznamenána enzymatická aktivita PAT převádějící preferát na arogenát, žádný gen kódující podobnou aktivitu nebyl dosud zcela objasněn. Předpokládá se možnost výskytu šesti údajných genů kódujících ADT izoenzym v *Arabidopsis* rostlinách, vykazující ADT aktivitu – tedy převod arogenátu na fenylalanin. Přesto tři z nich (ADT1, ADT2 a ADT6) údajně také mohou využívat preferát jako substrát a převést jej na fenylpyruvát. Obdobně lze nalézt nedávno charakterizované tři geny kódující ADT izoenzym i v petúnii (*Petunia hybrida*), preferenčně využívající arogenát jako substrát, ale v nižší míře i preferát. [16,26]



Obrázek 5: Schéma biosyntézy fenylalaninu [21]

3.2.4. Kyselina skořicová



Systematický název	kyselina (E)-3-fenylprop-2-enová
Triviální název	kyselina skořicová
Ostatní názvy	kyselina <i>trans</i> -skořicová, kyselina (E)-skořicová, kyselina fenylakrylová
Sumární vzorec	$C_9H_8O_2$

Obrázek 6: Struktura kyseliny skořicové [27]

Kyselina skořicová je organická sloučenina s chemickým vzorcem $C_6H_5CHCHCOOH$. Je to bílá krystalická látka. Získává se z oleje skořice nebo z balzámů, například storaxu. Nachází se také v bambuckém tuku. Lze ji vyrobit i synteticky. [27]

V průmyslu nachází využití v přípravě ochucovadel, syntetického indiga, ale i některých léčiv. Jejím primárním použitím je výroba methyl-, ethyl- a benzylesterů pro parfumářský průmysl. Kyselina skořicová má "medovou, květinovou vůni" (Merck index). Kyselina sama a její těkavější ethylester (ethylcinnamát) jsou vonné a chuťové složky esenciálního oleje skořice, získávaného z kůry různých druhů skořicovníků. Podstatnou složkou tohoto oleje je příbuzná látka cinnamaldehyd. [27]

Předmětem výzkumů je také využití kyseliny skořicové v léčbě diabetu pro údajné antihyperglykemizující účinky. [28]

Kyselina skořicová a její deriváty (např. kyselina kumarová, kávová, ferulová, sinapová a jiné) jsou velice rozšířené v rostlinné říši, mohou se vyskytovat též u mikroorganismů, řídčeji též u živočichů. V rostlinách se většinou nacházejí vázané na cukry, nebo jako estery kyseliny chinové. Ve velkém množství se vyskytují jako složka balzámů a živic. [2]

Deriváty kyseliny skořicové, zejména s fenolickou hydroxylovou skupinou, jsou známé jako antioxidanty. Kyselina skořicová má antimikrobiální aktivitu. Její deriváty izolované z rostlinného materiálu i syntetizované vykazují antibakteriální, antivirové a antimykotické vlastnosti. [29]

Redukcí karboxylové skupiny kyseliny skořicové vznikají přírodní látky s uhlíkatým řetězcem na aromtickém kruhu. Řetězec může být alylový (např. methylchavikol, safrol, myristicin či apiol) nebo 2-propylenový (např. anetol, eugenol, β -asaron, ale též cinnamaldehyd). Tyto látky jsou složkami silic čeledi miříkovitých, ale též již zmíněné skořicové silice. [2]

Kyselina skořicová je podstatnou součástí biosyntetických cest vedoucích ke vzniku šikimátu a fenylypropanoidů. Biosyntéza kyseliny skořicové z aminokyseliny fenylyalaninu probíhá za přítomnosti enzymu fenylyalaninamoniumlyázy (PAL), přítomného v rostlinných pletivech. Podrobněji se tomuto enzymu věnovala kapitola 3.1.3.1. Fenylyalaninamoniumlyáza (PAL). [16]

3.3. Explantátové kultury

3.3.1. Sekundární metabolity

Sekundární metabolity rostlin byly využívány po staletí v tradiční medicíně díky své biologické aktivitě. V současné době nachází uplatnění především ve farmaceutickém, kosmetickém a chemickém průmyslu. [30]

Rostlinné sekundární sloučeniny jsou obvykle klasifikovány dle jejich nejdůležitějších biosyntetických drah. Za hlavní skupiny obecně považujeme: fenoly, terpeny, steroidy a alkaloidy. [30]

Díky zdokonalení biochemických technik a vzestupu molekulární biologie, bylo jasněji ukázáno, že sekundární produkty hrají významnou roli v adaptaci rostlin k jejich prostředí. Například v ochraně rostliny před patogeny (fytoalexiny). Představují také významné UV absorbující látky zabraňující poškození listů působením světla. [30]

K produkci sekundárních metabolitů se po dlouhou dobu využívalo polní pěstování bylin. Nicméně rostliny pocházející z určitých biotopů může být obtížné pěstovat mimo jejich místní ekosystémy. Snahy vědců a biotechnologů vedly k hledání alternativních způsobů jak produkovat odpovídající sekundární metabolity prostřednictvím rostlinných buněk, tkáňových a orgánových kultur. [30]

Studium rostlinných sekundárních metabolitů se prohloubilo v posledních 50 letech. Již v roce 1960 byly zavedeny jako možný nástroj pro studium a produkci rostlinných sekundárních metabolitů technologie rostlinných buněčných kultur. Různé strategie, které byly používány v *in vitro* systémech, byly podrobně studované s cílem zlepšit produkci sekundárních rostlinných látek. V porovnání s diferencovanou rostlinou se buněčné kultury osvědčily jako ideální systém ke studiu biosyntézy přírodních látek na enzymové úrovni. V kulturách se

do biosyntézy ve většině případů zapojují a řídí ji stejné signály jako v intaktní rostlině. Především byly studovány nediferenciované buněčné kultury, ale velký zájem byl také věnován kulturám kořenových vlásků a dalším orgánovým kulturám. Byly zpracovávány také specifické procesy, které by splňovaly požadavky na kultivaci rostlinných buněk a orgánových kultur v bioreaktorech. Navzdory tomuto úsilí rostlinná biotechnologie v porovnání s jinými biotechnologickými oblastmi, jako jsou např. mikroorganizmy nebo savčí buněčné kultury, vedla k velmi malým komerčním úspěchům při produkci cenných sekundárních látek (šikonin, ginseng, taxany, indolové a tropanové alkaloidy). To může být vysvětleno nedostatkem základních znalostí o biosyntetických cestách nebo nedostatečně přizpůsobeným podmínkám v bioreaktorech. Objevením rekombinace DNA se otevřela nová možnost přímo modifikovat geny zapojené do biosyntézy, obměňovat cesty, které vedou k sekundárním rostlinným metabolitům. [30]

3.3.2. Kultury *in vitro*

Zjištění, že rostlinné buněčné kultury mohou produkovat sekundární metabolity, otevřelo cestu pro studium nových možností využití především ve farmaceutickém průmyslu. [30]

Při zakládání kultur *in vitro* po výběru nejslibnějších jednotlivých rostlin následuje iniciace kalusu. Ta spočívá především v určení média optimálně přizpůsobeného k jeho pěstování. Důležitý je obsah minerálních a organických složek se zvláštním důrazem na hormonální rovnováhu, která se pojí s dediferenciačními a diferenciačními mechanismy. [30]

Získané kalusy poté prochází somaklonální variací, obvykle v několika subkulturálních cyklech. To je velmi důležité období pro stabilizaci často variabilní produkce sekundárních metabolitů v jednotlivých subkulturách díky *in vitro* změnám. Po určité době (od několika týdnů do několika let) se dosáhne genetické stability a každý kalus může být považován za homogenní buněčný agregát. [30]

Pro každý kalus samostatně by měla být posuzována rychlost růstu, intracelulární a extracelulární koncentrace metabolitů. To umožňuje vyhodnocení produktivity každé buněčné linie a určení, které nejlepší lze využít do buněčných suspenzí a bioreaktorových studií.

Ve srovnání s kinetikou buněčného růstu, který je obvykle exponenciální křivky, většina sekundárních metabolitů je produkováných během tzv. plató fáze. Což lze vysvětlit rozdělením distribuce uhlíku v aktivní fázi růstu především pro primární metabolismus (stavbu buněčných struktur a dýchání). Když se růst zastavuje, uhlík již není zapotřebí ve velkém množství pro primární metabolismus a sekundární sloučeniny jsou aktivněji syntetizované. Bylo pozorováno, že některé enzymatické aktivity v průběhu lag i log fáze chybějí a objeví se až ve fázi plató, tedy ve fázi doznívání nebo dočasného poklesu buněčného růstu. [30]

Vztah mezi růstem explantátových kultur a sekundárním metabolismem není často přesně vymezen, většinou však existuje nepřímá závislost mezi rychlostí růstu a akumulací sekundárních metabolitů (podobně je tomu i u sledované explantátové kultury *Trifolium pratense* L.) Větší rychlost růstu v suspenzní kultuře než v kalusové kultuře lze vysvětlit přímým kontaktem buněk s živným médiem, což zaručuje snadnější přístup živin a výměnu dýchacích plynů. Z toho důvodu bývají buněčné suspenzní kultury také fyziologicky jednodušší a jsou nejvíce využívány ke studiu produkce sekundárních metabolitů, indukce enzymů a biosyntetických drah. Oproti kalusovým kulturám umožňují využití většího množství buněk, ze kterých mohou být enzymy snadněji izolované. Díky těmto studiím lze rozpoznat také omezení aktivity enzymů či genů, ke kterému dochází při produkci významných metabolitů. [30]

Perspektivní metodou používanou pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů je elicitace. Využívá obranných mechanismů rostlin k tomu, aby se zvýšila produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i v kulturách *in vitro*. Je to ekonomicky výhodný způsob získávání přírodních látek. Elicitory jsou látky, které aktivují určité enzymy, které katalyzují tvorbu fytoalexinů, což jsou

nízkomolekulární obranné látky sekundárního metabolismu, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují.

Rozlišujeme dvě skupiny elicitorů: biotické (mezi které patří například SA, kyselina jasmínová nebo celé organizmy či jejich části: viry, bakterie, houby) a abiotické elicitory (mezi které řadíme soli těžkých kovů, vysokou teplotu, UV záření, detergenty). [7,30]

Závěrečným krokem k možnému komerčnímu využití produkce sekundárních metabolitů z kultur rostlinných buněk jsou bioreaktorové studie. Úskalí, se kterými se tato fáze potýká, vznikají zejména změnou měřítka použitých technologií. Velkým problémem je také rozsáhlé odumírání buněk díky jejich citlivosti na smykové napětí vznikající třepáním v kultivačním médiu. Možná řešení se nachází využitím bioreaktorů s bublinovým sloupcem a vzdušným výtahem. K dosažení optimální produkce sekundárních metabolitů je třeba, aby kultury rostlinných buněk procházely v bioreaktoru dobře přizpůsobenými procesy. Tyto procesy se proto neustále studují a hledají se nové možnosti zlepšení průmyslového využití. [30]

Podrobněji jsem téma kultur rostlinných explantátů popsala v diplomové práci v kapitole 3.2. Rostlinné explantáty. [7]

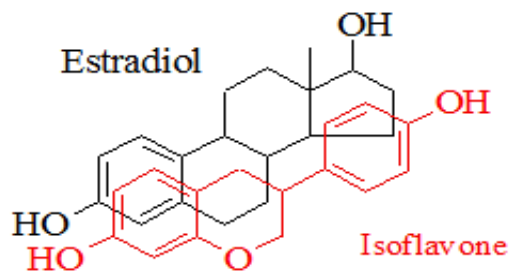
3.4. Jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*)



Obrázek 7: Jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) [31]

Rod *Trifolium* (*Fabaceae*) zahrnuje přibližně 240 druhů jetele, vyskytujících se v mírných a subtropických oblastech. Některé druhy jsou po staletí známé jako píceňiny a hodnotné byliny v lidovém lékařství různých kultur. Například východní a evropské kultury jetel používaly k léčbě ekzému a lupenky. V turecké tradiční medicíně byl podáván jako expektorans, antiseptikum nebo v analgetických, sedativních a tónizujících směsích. [32,33]

V současné době je terapeutické použití jetele stále založeno na tradičních doporučeních. Stoupá však počet vědeckých údajů o biologické účinnosti a jeho možných terapeutických účincích. Většina studií biologických vlastností se týká jetele lučního (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) a je nejčastěji zaměřena na jeho fytoestrogenní aktivitu spojenou s obsahem isoflavonoidů. Interakce isoflavonů s estrogenními receptory jsou možné díky jejich strukturální podobnosti se steroidním hormonem 17 β -estradiolem. [32,34]



Obrázek 8: Porovnání struktury endogenního a exogenního estrogenu [35]

Podrobný botanický popis a původ jetele lučního, jeho výskyt a pěstování, sběr a úpravu drogy, použití, obsahové látky (flavonoidy, isoflavonoidy) popisují v diplomové práci. [7]

3.4.1. Významné účinky isoflavonů jetele lučního

Ačkoli klinickému hodnocení fytoestrogenů je již mnoho let věnována velká pozornost, výsledné studie podávají poměrně nejednotný obraz jejich klinické účinnosti. Může to být dáno například rozdílným složením přípravků, individuálními schopnostmi pacientů konvertovat podávané fytoestrogeny na účinnější látky, či důsledkem poměrně malého počtu studií, které by splňovaly přísná kritéria. Nicméně je zřejmé, že mezi výzkumnými pracovníky a lékaři vzrůstá zájem o isoflavony získané z extraktu jetele lučního. To potvrzuje řada klinických studií, které prokázaly, že příjem isoflavonů z jetele lučního ve srovnání s placebem významně snižuje klimakterické potíže, jako jsou návaly horka, pocení, poruchy spánku a deprese, suchost sliznic, hypertenze, a má nezanedbatelný význam při prevenci osteoporózy, kardiovaskulárních a nádorových onemocnění. [36-43]

Z četných publikací, přednášek a diskuzí vyplývá, že isoflavony jetele lučního (pocházejícího především z evropských zemí) slibují mnohem větší možnosti než jen to, že se jedná o jemnou přírodní výpomoc při mírných až středně těžkých menopauzálních potížích. I přesto, že stále ještě existuje řada nezodpovězených

otázek a nové poznatky přinášejí často i nové problémy, se zdá, že příznivý vliv těchto fytoestrogenů na lidské zdraví převažuje nad případnými riziky. [44,45]

Extrakty především z jetele lučního a sóji jsou podstatou většiny potravních doplňků [46,47], které jsou doporučované jako vhodná přírodní alternativa ke klasické hormonální substituční terapii. Mezi dostupné potravní doplňky s obsahem jetelových isoflavonů patří například: FEMIFLAVON, MENOFLAVON, MINAPENT BALANCE. Přípravky SARAPIS SÓJA, ČERVENÝ JETEL PLUS SOJA obsahují směs isoflavonů ze sóji a jetele. Přípravek MABELLE je kombinací extraktů ze lnu setého a jetele lučního (směs lignanů a isoflavonoidů). IVE INKONTINSTOP obsahuje směs isoflavonů z natě jetele lučního a sóji, lignanů ze semen lnu setého a flavonolignanů ze semen ostropestřce mariánského. MINAPENT SE ŠALVĚJÍ je příkladem preparátu s obsahem jetele lučního a ploštičnicku hroznovitého [48].

Své terapeutické uplatnění by jetel luční mohl najít nejen díky fytoestrogenní aktivitě, ale také protizánětlivým a antitrombotickým účinkům, antioxidačním, antiangiogenním a protirakovinným vlastnostem, zejména u rakoviny prsu a prostaty.

Možnou roli by mohl mít i v terapii metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění. [32]

Na etiologii a patofyziologii zánětu, rakoviny či autoimunních, neurodegenerativních, kardiovaskulárních a jiných onemocnění se mimo jiné významně podílí nadprodukce reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS/RNS). Rostoucí počet *in vitro* a *in vivo* studií ukazuje na antioxidační vlastnosti isoflavonů. Např. příjem formononetinu výrazně zvýšil činnost enzymů superoxidismutázy, glutathionperoxidázy, katalázy a následně snížil peroxidaci lipidů v těle zvířat. Kromě isoflavonů se na antioxidační aktivitě mohou podílet také flavonoidy a další fenolické sloučeniny jako katechiny, saponiny, klovamidy a fenolické kyseliny přítomné v rostlině. [32]

Až v nedávné době byly zhodnoceny účinky jetele na hemostatický systém. Aktivace krevních destiček a jejich hromadění v místě cévního poškození je důležité

pro fyziologické srážení krve. Krevní destičky jsou také zodpovědné za tvorbu patogenních trombů a současně mají vliv na průběh různých kardiovaskulárních onemocnění včetně aterosklerózy, infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhody.

Bylo zjištěno, že isoflavonoidy jetele lučního mohou aktivovat antiagregační faktor – syntézu oxidu dusnatého (NO) v endotelových buňkách stimulací transkripční dráhy. Prodloužená expozice kultivovaných lidských endoteliálních buněk extraktům jetele lučního měla vliv na zvýšenou expresi a aktivitu endoteliální syntézy oxidu dusnatého (eNOS). Molekulární mechanismy těchto účinků mohou zahrnovat účast β -estrogenního receptoru a tím možné synergistické působení s 17 β -estradiolem. [32]

V dalších pokusech se ukázala možnost působení isoflavonoidů jetele lučního na potlačení zánětu v souvislosti s inhibicí aktivity cyklooxygenázy a následného snížení syntézy prostaglandinu E₂ či tromboxanu B₂ v linii makrofágových buněk a lidských monocytů. [32]

Popsaný byl také vliv isoflavonoidů na angiogenezi díky jejich chemoprolifaktickému působení. Isoflavony, včetně genisteinu a daidzeinu, snižují expresi genů a mRNA proteinů zapojených do procesu angiogeneze a také ovlivňují regulaci syntézy antiangiogenních faktorů. Nemetylované isoflavony genistein a daidzein mají silnější antiangiogenní aktivitu než metylované sloučeniny formononetin a biochanin A. [32]

Rozsah léčivých účinků jetele lučního může zahrnovat také zlepšení metabolického syndromu ovlivněním funkce PPAR γ receptorů. Jetelové extrakty a isoflavony genistein a biochanin A mohou působit jako ligandy a aktivátory těchto receptorů. Některé metabolity isoflavonů mohou *in vitro* vykazovat vyšší vazebnou afinitu nebo transaktivační aktivitu než molekuly jejich prekurzorů (např. 6-hydroxydaidzein měl více než 100-krát vyšší vazebnou afinitu než jeho prekurzor daidzein). Pozorovaná maximální transaktivační aktivita 6-hydroxydaidzeinu a 3-hydroxygenisteinu přesahovala účinek léčivé látky rosiglitazonu, PPAR γ agonisty.

Kromě ovlivnění funkce těchto receptorů bylo pozorováno snížení krevního tlaku vlivem isoflavonoidů jetele lučního. Údaje týkající se ovlivnění lipidů a cholesterolu v krvi nejsou prozatím zcela jednotné. [32]

Dalším z možných účinků isoflavonoidů jetele lučního je neuroprotektivní efekt pozorovaný v experimentech u biochaninu A. V rozmezí koncentrací 0,25 - 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ biochanin A vykazoval ochranu dopaminergních neuronů před lipopolysacharid-indukovaným poškozením omezením aktivace mikroglíí a tvorby prozánětlivých faktorů. [32]

3.4.2. Potenciální léčebné účinky méně známých druhů jetele

Značný vědecký zájem získává také biologická aktivita a potenciální léčebné účinky jiných *Trifolium* druhů, u kterých byly rovněž zjištěny antioxidační a protizánětlivé účinky, antiangiogenní a protirakovinné vlastnosti (např. *T. repens* L., *T. resupinatum* L., *T. pallidum* Waldst. & Kit., *T. alexandrinum* L. aj.) Nicméně terapeutické využití těchto druhů je omezeno nedostatkem klinických dat a jsou potřebné další výzkumy. Porovnání jednotlivých zkoumaných druhů jetele uvádím v následujícím přehledu (Obr 9). [32]

Species - druhy	Využití v lidové medicíně	Výsledky studií biologické aktivity - účinků	Současné využití a možné budoucí aplikace
<i>Trifolium pratense</i> L. (jetel luční)	expektorans, antiseptikum, analgetikum, léčba bolesti v krku, horečky, zápalu plic, meningitidy, kožních problémů, plicních nemocí, některých poruch nervového a reprodukčního systému	estrogenní účinek, antioxidační, protideštičková, antiangiogenní aktivita, protinádorové vlastnosti	klimakterické obtíže, potenciálně užitečné v léčbě rakoviny a prevenci kardiovaskulárních chorob
<i>T. alexandrinum</i> L. (jetel egyptský)	antidiabetická bylina	antioxidační, hepatoprotektivní, antibakteriální účinky	
<i>T. angustifolium</i> L. (jetel úzkolistý)	bolesti břicha, průjem	slabé antioxidační vlastnosti	
<i>T. fragiferum</i> L. (jetel jahodnatý)		inhibice tyrosinázy	potenciálně využitelné v léčbě kožních onemocnění souvisejících s biosyntézou melaninu
<i>T. pallidum</i> Waldst. & Kit. (jetel bledý)		antioxidační, antiagregační účinek	potenciálně využitelné v antiagregační terapii
<i>T. repens</i> L. (jetel plazivý)	analgetikum revmatických onemocnění, odčervující prostředek, léčba bolesti v krku, horečky, zápalu plic, meningitidy	anthelmintické vlastnosti	

Obrázek 9: Biologická aktivita a potenciální terapeutické účinky různých druhů jetele. [32]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky

4.1.1. Rostlinný materiál

K pokusům uvedeným v této práci byla použita explantátová kultura, odvozená ze sterilní klíční rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (varietá DO 8). Semena byla získaná ze Šlechtitelské stanice Domoradice. Elicitace byla provedena u čtyřleté kalusové a suspenzní kultury.

4.1.2. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105°C, byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena a sušena 2 hodiny v sušárně při 105°C. Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 5,69 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení. [49]

4.1.3. Chemikálie

- 6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno
- Dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno
- Dusičnan draselný *p. a.*, Lachema, Brno
- Dusičnan amonný *p. a.*, Lachema Brno
- Ethanol 96%, Lachema, Brno
- Glycin č., Lachema Brno
- Chloramin B, Lachema, Brno
- Chlorid kobaltnatý *p. a.*, Lachema, Brno

- Chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid vápenatý *p. a.*, Lachema, Brno
- Jodid draselný *p. a.*, Lachema, Brno
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno
- Kyselina a-naftyloctová č., Lachema Brno
- Kyselina boritá *p. a.*, Lachema, Brno
- Kyselina chlorovodíková *p. a.*, Lachema, Brno
- Kyselina mravenčí bezvodá *p. a.*, Lachema, Brno
- Kyselina nikotinová č., Lachema, Brno
- Kyselina octová bezvodá *p. a.*, Lachema, Brno
- Kyselina octová ledová *p. a.*, Lachema, Brno
- Kyselina skořicová č., Lachema, Brno
- Kyselina šťavelová č., Lachema, Brno
- Methanol *p. a.*, Lachema, Brno
- Molybdenan sodný *p. a.*, Lachema, Brno
- Myoinositol č., Sigma, St. Louis
- Phenylalanine *p. a.*, Sigma-Aldrich, Buchs
- Sacharóza *p. a.*, Lachema, Brno
- Síran amonný *p. a.*, Lachema, Brno
- Síran hořečnatý *p. a.*, Lachema, Brno
- Síran manganatý *p. a.*, Lachema, Brno
- Síran měďnatý *p. a.*, Lachema, Brno
- Síran zinečnatý *p. a.*, Lachema, Brno
- Síran železnatý *p. a.*, Lachema, Brno

4.1.4. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- Horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina

- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Třepačka Unimax 2010, Heidolph
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), Merck, Darmstadt
- Kolona LiChrosper RP-18 250x4 (5µm) s předkolonkou, Merck, Darmstadt

4.2. Kultivace explantátové kultury

4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje

Ke kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla značky SIAL, které je dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot. Kalusové kultury byly kultivovány ve 100ml Erlenmeyerových baňkách, suspenzní kultury ve 250ml varných baňkách z téhož skla.

Kovové nástroje byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové fólie sterilizovány 2 hodiny v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200°C. Pipety byly také sterilizovány v hliníkové fólii v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.2.2. Příprava živného média

Pro kultivaci explantátových kultur bylo použito živné médium podle Gamborga, které má následující složení: [50]

KNO ₃	2 500,00	mg.l ⁻¹
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	150,00	mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	250,00	mg.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00	mg.l ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150,00	mg.l ⁻¹

FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,84	mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,34	mg.l ⁻¹
KI	0,75	mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	3,00	mg.l ⁻¹
MnSO ₄ · H ₂ O	10,00	mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,00	mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg.l ⁻¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	mg.l ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	mg.l ⁻¹
myoinositol	100,00	mg.l ⁻¹
kyselina nikotinová	1,00	mg.l ⁻¹
pyridoxin	1,00	mg.l ⁻¹
thiamin	10,00	mg.l ⁻¹
sacharóza	30 000,00	mg.l ⁻¹

Jednotlivé substance byly odváženy na analytických vahách (nízké koncentrace byly pipetovány z připravených zásobních roztoků). Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněno destilovanou vodou po značku.

Jako stimulant růstu byla použita 2 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina v kombinaci s 2 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurinem. [51]

Půda připravená pro kultivaci byla rozlita po 30 ml do Erlenmeyerových baněk s vloženými papírovými můstky pro kultivaci kalusových kultur a po 25 ml do varných baněk určených pro kultivaci suspenzní kultury. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 min. při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.2.3. Pasážování a kultivace

Pasážování bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Při práci byly vždy zachovány přísně aseptické podmínky, bylo použito sterilní sklo a nástroje.

Části kalusové kultury byly přeneseny pinzetou na můstky z filtračního papíru v Erlenmeyerových baňkách s kultivačním médiem, pečlivě uzavřeny hliníkovou fólií a kultivovány při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Subkultivační interval byl 35 dní.

Suspenzní kultura byla kultivována za stejných kultivačních podmínek na pomaloběžném roleru. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech subkultivace přenesením části narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem. [51]

4.3. Aplikace prekurzorů biosyntézy fenylypropanoidů

4.3.1. Příprava vzorků prekurzorů

Použitými prekurzory biosyntézy fenylypropanoidů byla kyselina skořicová a fenylyalanin v koncentraci 10 mmol.l⁻¹, která byla zvolená na základě předchozích pokusů [52]. V případě kyseliny skořicové byl připraven lihový roztok v 70% ethanolu, v případě fenylyalaninu vodný roztok, který byl sterilizován v autoklávu 15 min při 121°C a tlaku 0,1 MPa.

4.3.2. Aplikace prekurzorů a odběr kultur

Prekurzory biosyntézy fenylypropanoidů (kyselina skořicová a fenylyalanin) byly přidány za aseptických podmínek k suspenzní kultuře ve 21. dni kultivace a ke kalusové kultuře v 28. dni kultivace.

K pokusu bylo vzato pro každý prekurzor 42 kultivačních baněk s kalusovou a suspenzní kulturou. Soubor 12 baněk bez přidaného prekurzoru sloužil jako kultura kontrolní. Do ostatních 30 baněk s kulturou byl napipetován vždy 1,00 ml prekurzoru o koncentraci 10 mmol.l⁻¹. Dále byly kultury kultivovány za již uvedených podmínek. Po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách aplikace prekurzoru byly kultury odebrány. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 hodinách a 168 hodinách. Buňky explantátových kultur byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2009 a stanovení isoflavonoidů pomocí HPLC.

4.4. Stanovení obsahu flavonoidů

4.4.1. Princip stanovení

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. [49]

4.4.2. Postup stanovení

Základní roztok: 0,200 - 0,400 g práškové kultury se ve 250ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60 % (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60°C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 250ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60 % (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60°C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky. 250ml baňka i filtr se promyjí *lihem R 60 % (V/V)* a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí *lihem R 60 % (V/V)* na 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

Zkoušený roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml roztoku, který obsahuje *kyselinu boritou R* (25,0 g/l) a *kyselinu šťavelovou R* (20,0 g/l) v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,235}{m}$$

m

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

m – hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v tabulkách č. 1 - 4 (viz. kapitola 5).

4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Stanovení daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí. [53]

4.5.1. Příprava vzorku

Asi 0,2000 – 0,4000 g upráškované kultury se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml methanolu 80 % a extrahuje se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15 ml methanolu 80 % a extrahuje se ještě jednou 20 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky a spojené extrakty se zředí methanolem 80 % na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC.

4.5.2. Parametry HPLC analýzy

- **Chromatograf:** Jasco (autosampler AS-2055, čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015), vybavené předkolonovým filtrem.
- **Kolona:** LiChrospher RP-18 (250x4 mm, velikost částic 5 μ m) s ochranou předkolonkou.
- **Objem nástřiku:** 20 μ l.

- **Mobilní fáze:**

Fáze A: methanolický roztok kyseliny *o*-fosforečné (0,15% m/v).

Fáze B: vodný roztok kyseliny *o*-fosforečné (0,15% m/v).

Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově. V čase $t = 0$ bylo složení 30 % methanolu a 70 % vody, v čase $t = 9$ min 80 % methanolu a 20 % vody. Následovala isokratická eluce stejným složením do času $t = 15$ min.

- **Průtok:** 1,1 ml/min, a mobilní fáze obsahovala jako pufr 0,15 % kyseliny fosforečné.
- **Detekce:** DAD Jasco MD-20015, $\lambda = 200-600$ nm, vyhodnoceno při vlnové délce 260 nm.
- **Standardy:** genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A.

Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v tabulce č. 5, 6 (viz. kapitola 5).

4.6. Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování naměřených hodnot obsahu flavonoidů v kulturách *Trifolium pratense* L. bylo provedeno na základě T – testu (test významnosti rozdílu dvou průměrů), pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$. [54,55] Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách č. 1 - 4 (viz. kapitola 5).

Aritmetický průměr

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (1)$$

Směrodatná odchylka

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

n rozsah souboru

x_i naměřené hodnoty

\bar{x} aritmetický průměr

s směrodatná odchylka

T – test

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \times \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \quad (3)$$

n_1 počet členů pokusného souboru

n_2 počet členů kontrolního souboru

\bar{x}_1 aritmetický průměr pokusného souboru

\bar{x}_2 aritmetický průměr kontrolního souboru

s_1 směrodatná odchylka pokusného souboru

s_2 směrodatná odchylka kontrolního souboru

t testovací kritérium

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (ν) vypočítaného podle vztahu: $\nu = n_1 + n_2 - 2$.

Vypočtená hodnota testovacího kritéria (t) se porovná s příslušnou kritickou hodnotou $t_p(\nu)$ pro vypočítaný stupeň volnosti (ν) a zvolenou hladinu významnosti (p). Je-li hodnota t větší než hodnota $t_p(\nu)$ je rozdíl $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ statisticky významný na hladině významnosti (p).

Pro vypočtený počet stupňů volnosti $\nu = 2$ a pro $p (0,05)$ se kritická hodnota $t_p(\nu) = 3,182$. [54,55]

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabulky

Tabulka č. 1: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

Kultura suspenzní					
Doba aplikace kyseliny skořicové (hod)	Aplikace prekurzoru		Kontrola		T- test
	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	
6	0,110	0,013	0,150	0,005	2,872
24	0,182	0,011	0,150	0,005	2,648
48	0,171	0,011	0,150	0,005	1,738
72	0,150	0,027	0,150	0,005	0,000
168	0,118	0,011	0,089	0,003	2,543

Tabulka č. 2: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci fenylalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

Kultura suspenzní					
Doba aplikace fenylalaninu (hod)	Aplikace prekurzoru		Kontrola		T- test
	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	
6	0,212	0,008	0,150	0,005	6,572
24	0,194	0,016	0,150	0,005	2,625
48	0,246	0,010	0,150	0,005	8,587
72	0,262	0,027	0,150	0,005	4,079
168	0,131	0,003	0,089	0,003	9,899

Zvýrazněné hodnoty obsahu flavonoidů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly, $p = 0,05$.

Tabulka č. 3: Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

Kultura kalusová					
Doba aplikace kyseliny skořicové (hod)	Aplikace prekurzoru		Kontrola		T-test
	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	
6	0,148	0,006	0,131	0,015	1,052
24	0,114	0,003	0,131	0,015	1,111
48	0,154	0,006	0,131	0,015	1,424
72	0,129	0,024	0,131	0,015	0,071
168	0,114	0,003	0,119	0,003	1,179

Tabulka č. 4: Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci fenylalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

Kultura kalusová					
Doba aplikace fenylalaninu (hod)	Aplikace prekurzoru		Kontrola		T-test
	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka s	
6	0,155	0,008	0,131	0,015	1,412
24	0,161	0,003	0,131	0,015	1,961
48	0,148	0,007	0,131	0,015	1,027
72	0,135	0,005	0,131	0,015	0,253
168	0,105	0,003	0,119	0,003	3,300

Tabulka č. 5: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové a fenylyalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

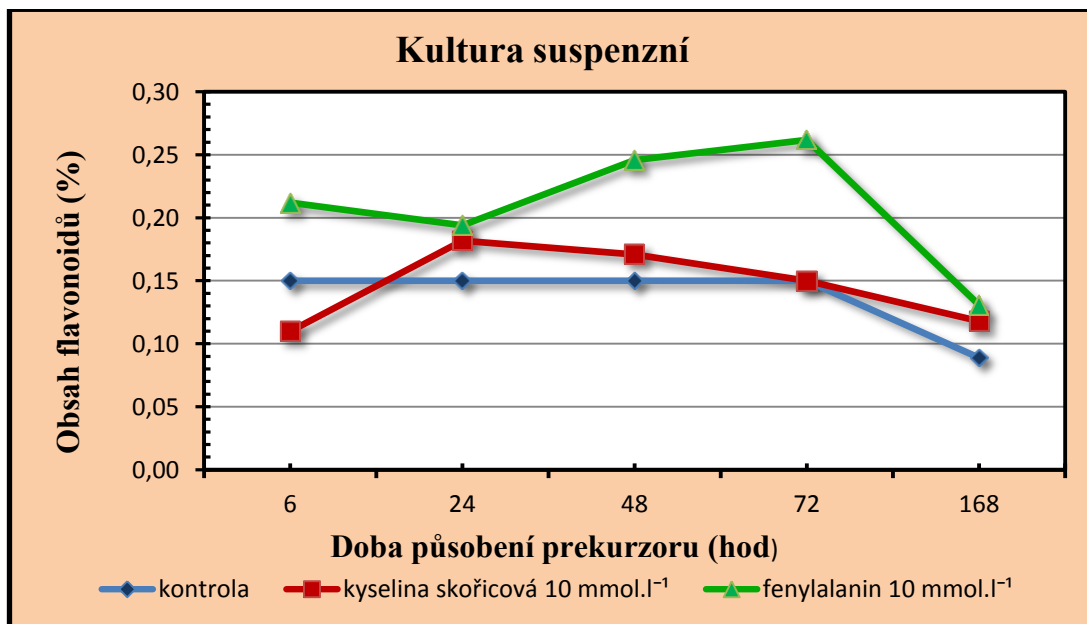
Kultura suspenzní						
Aplikace prekurzoru	Doba aplikace prekurzoru (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)				
		Genistin	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
Kyselina skořicová (10 mmol.l ⁻¹)	6	-	0,01	-	-	-
	24	-	0,03	0,01	-	-
	48	-	0,03	0,01	0,03	-
	72	-	0,03	-	0,03	-
	168	0,02	0,01	-	0,02	-
Fenylyalanin (10 mmol.l ⁻¹)	6	0,05	0,00	0,01	0,03	-
	24	0,11	0,04	0,01	0,04	-
	48	0,04	0,02	0,01	0,04	-
	72	0,11	0,04	0,03	0,05	-
	168	0,06	0,01	-	0,03	-
Kontrola	6	0,04	0,03	0,01	0,03	-
	24	0,04	0,03	0,01	0,03	-
	48	0,04	0,03	0,01	0,03	-
	72	0,04	0,03	0,01	0,03	-
	168	0,08	0,01	-	0,02	-

Tabulka č. 6: Produkce isoflavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové a fenylalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

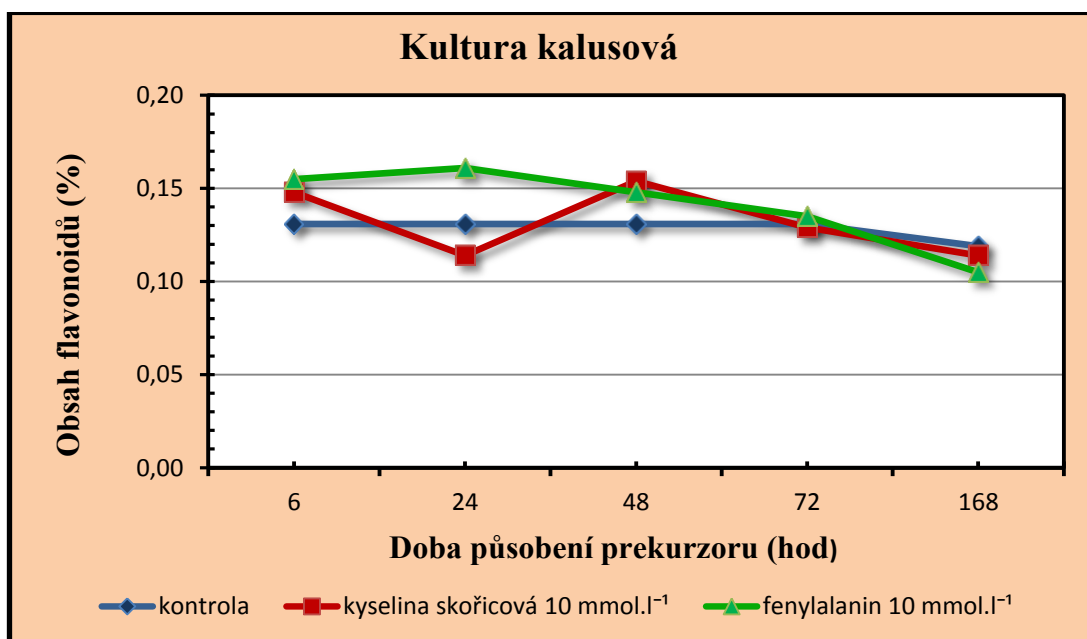
Kultura kalusová						
Aplikace prekurzoru	Doba aplikace prekurzoru (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)				
		Genistin	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
Kyselina skořicová (10 mmol.l ⁻¹)	6	0,05	-	-	0,01	-
	24	0,07	0,02	0,01	0,01	-
	48	0,03	0,02	0,01	0,01	-
	72	0,05	-	0,01	-	-
	168	0,06	0,02	-	-	-
Fenylalanin (10 mmol.l ⁻¹)	6	0,03	0,01	0,01	0,01	-
	24	0,11	0,04	0,01	0,03	-
	48	0,08	-	0,01	0,02	-
	72	0,02	-	-	-	-
	168	0,01	-	-	-	-
Kontrola	6	0,02	-	-	-	-
	24	0,02	-	-	-	-
	48	0,02	-	-	-	-
	72	0,02	-	-	-	-
	168	0,02	-	-	-	-

5.2. Grafy

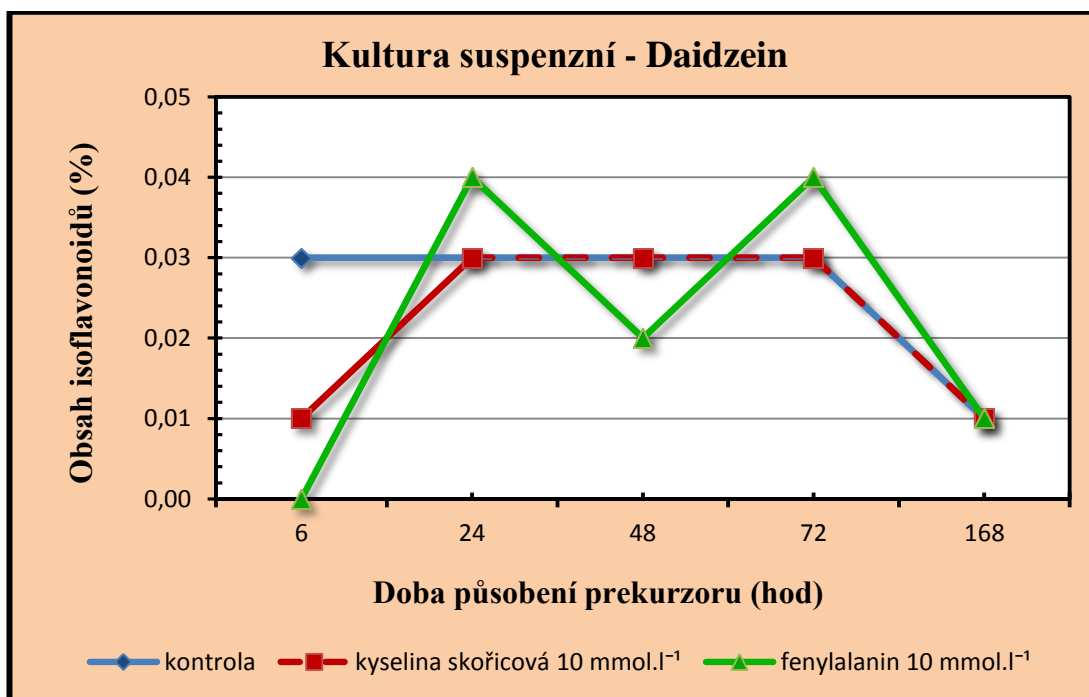
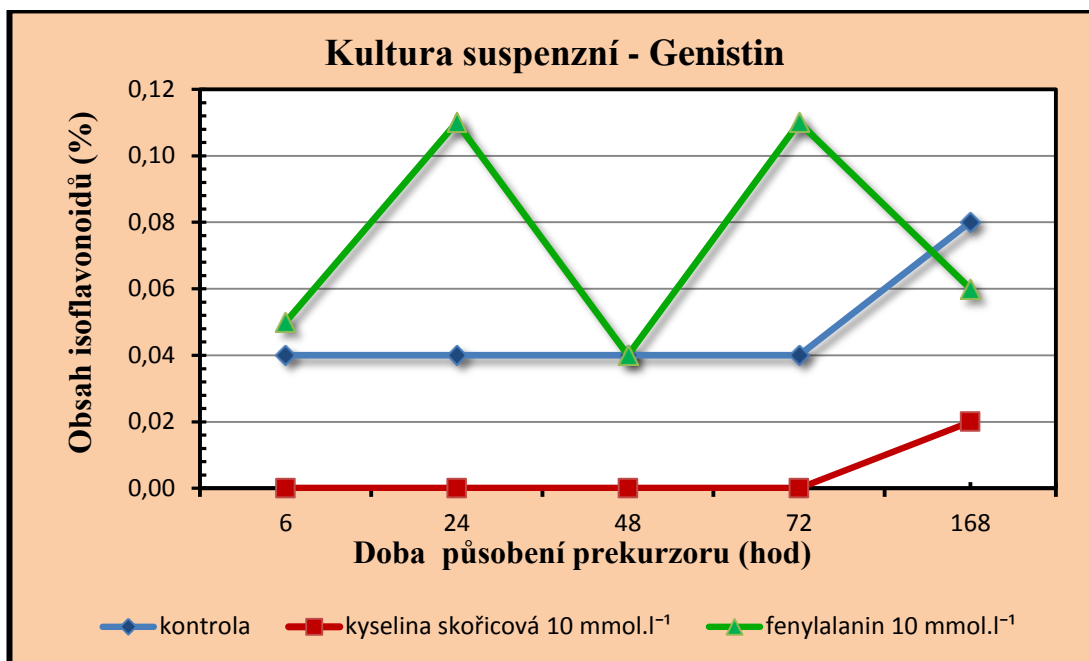
Graf č. 1: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové a fenylalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

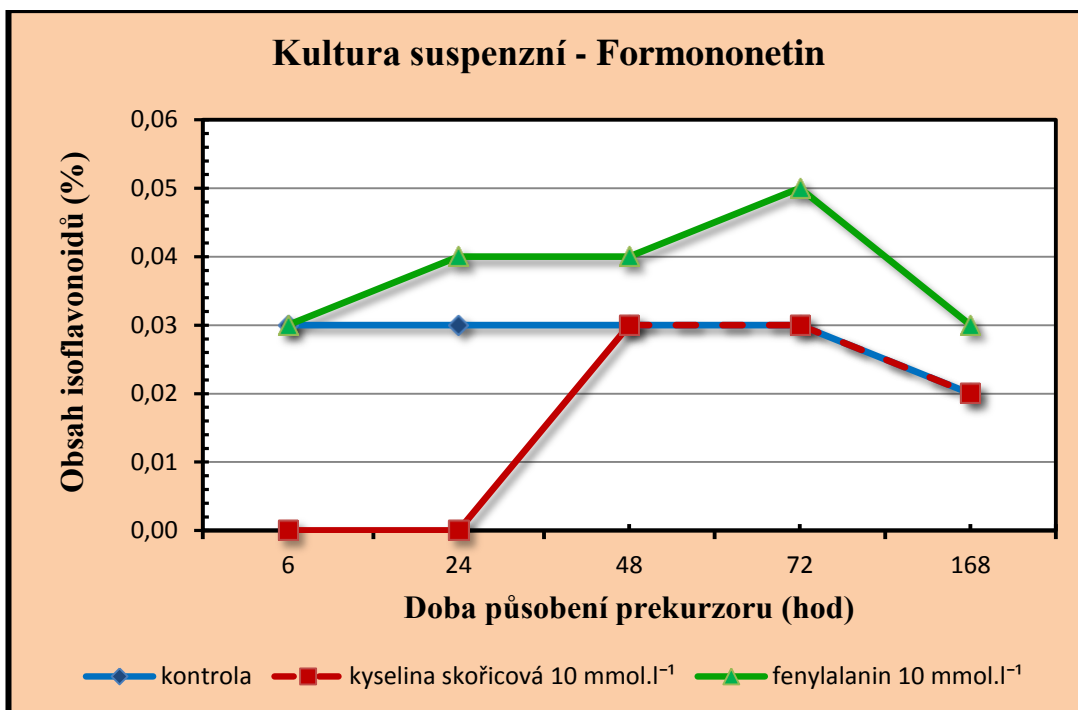
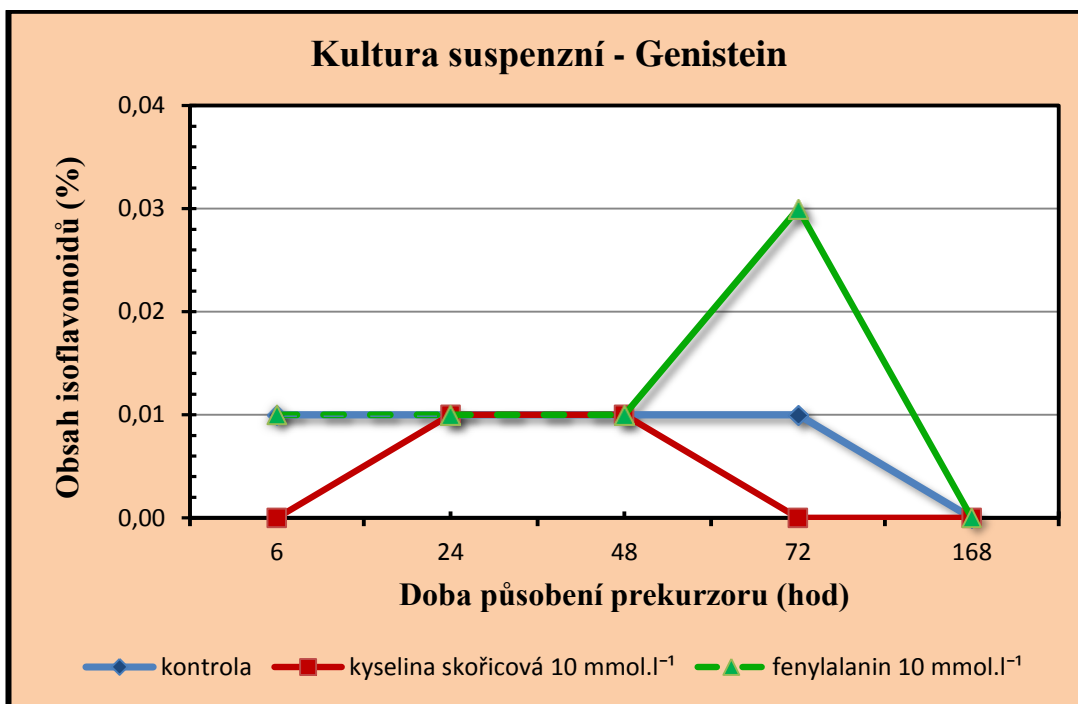


Graf č. 2: Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové a fenylalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)

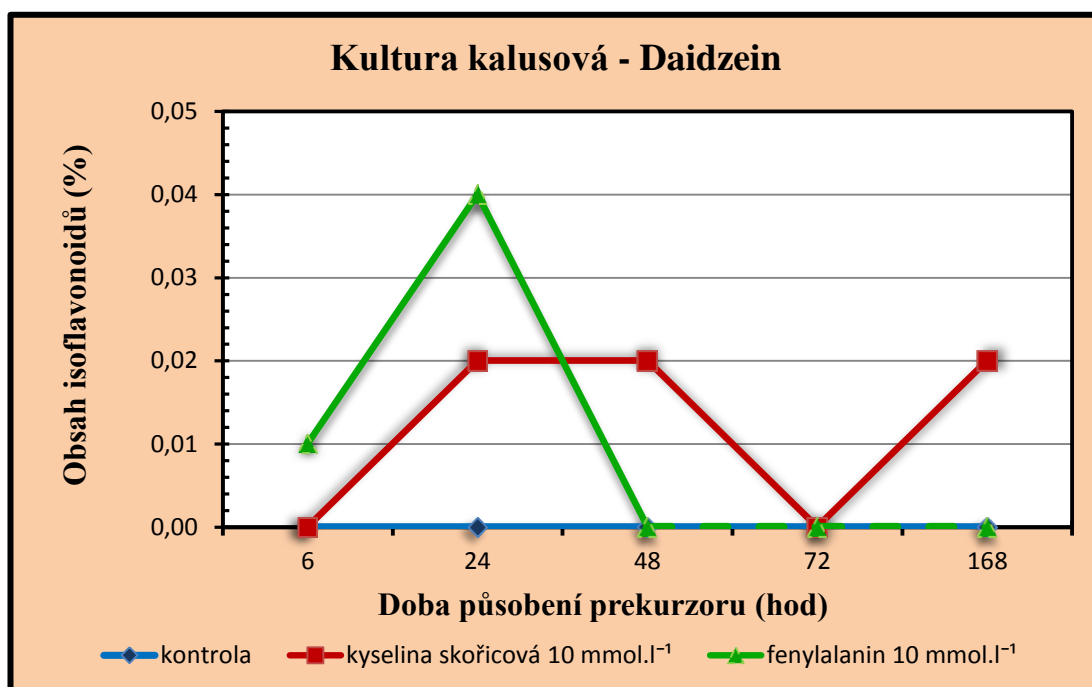
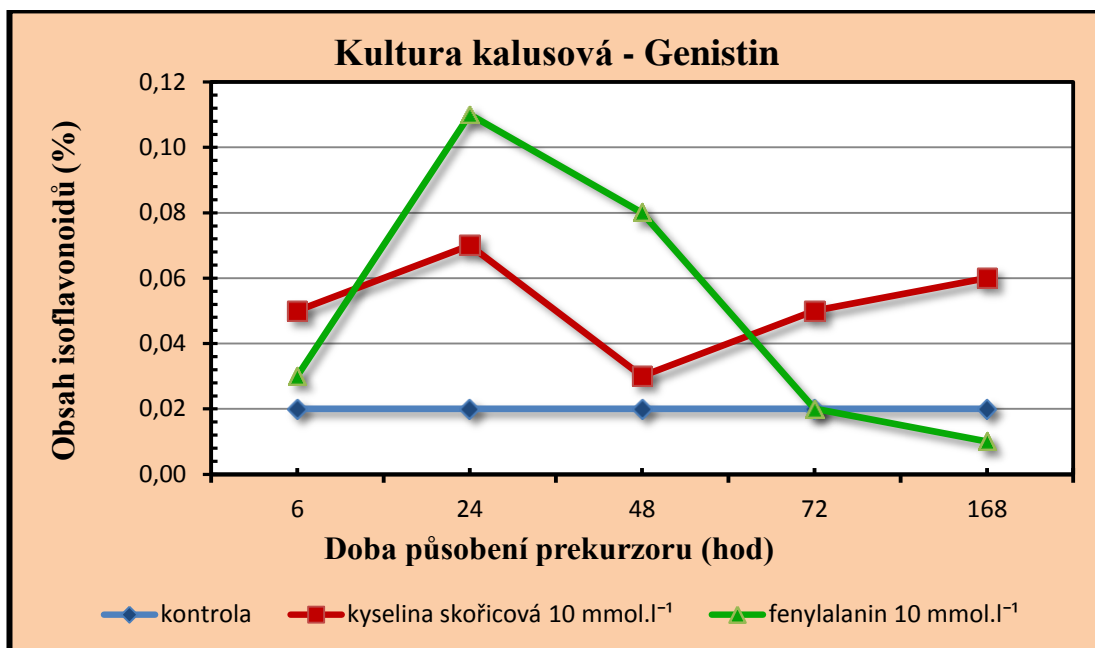


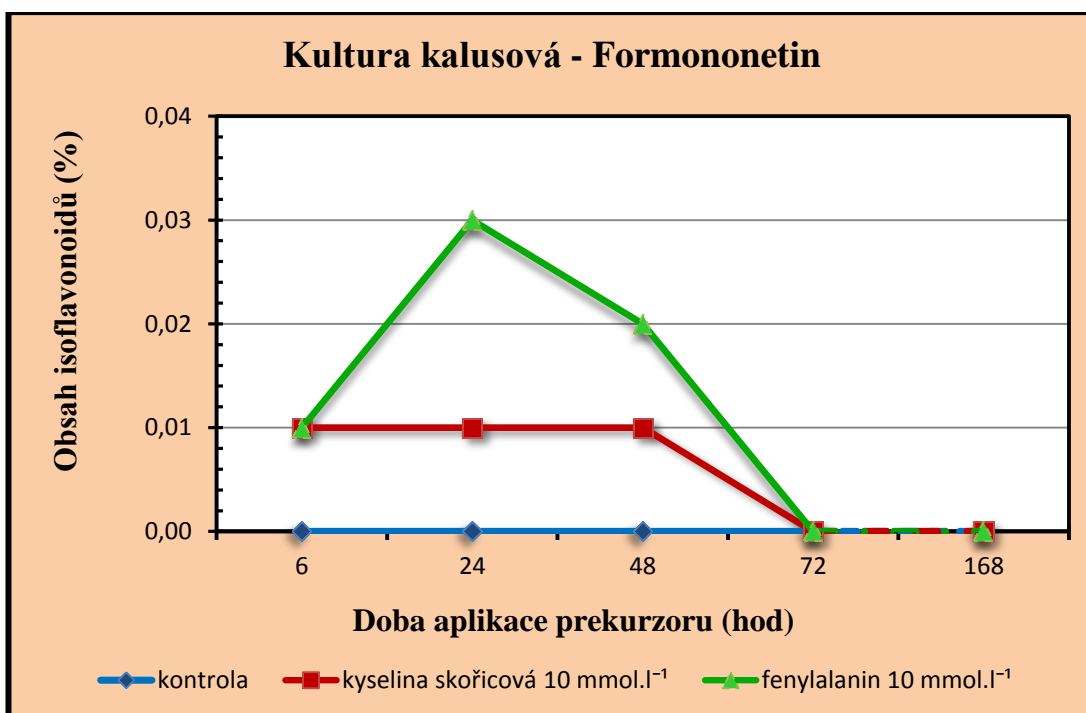
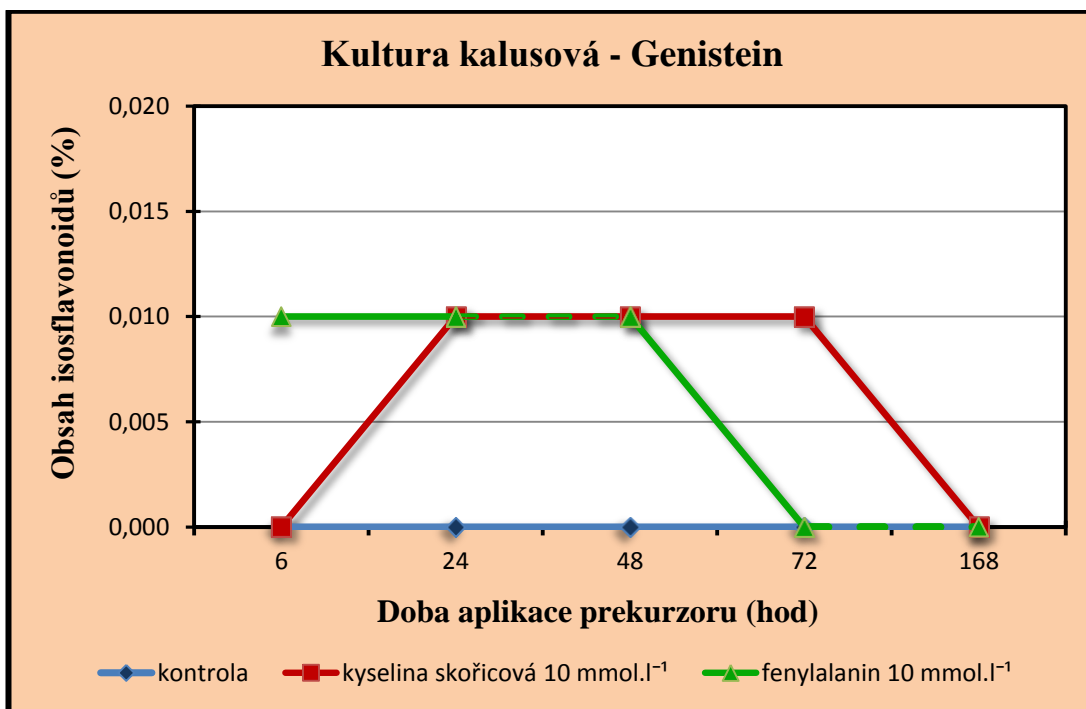
Graf č. 3: Produkce isoflavonoidů (genistin, daidzein, genistein, formononetin) v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové a fenylalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)





Graf č. 4: Produkce isoflavonoidů (genistin, daidzein, genistein, formononetin) v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po aplikaci kyseliny skořicové a fenylalaninu (koncentrace 10 mmol.l⁻¹)





6. DISKUZE

Fenylpropanoidy jsou syntetizovány šikimátovou cestou za pomoci aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu. Základním meziproduktem biosyntézy je kyselina skořicová nebo její hydroxyderiváty. Přidání prekurzorů biosyntézy je jednou z možností, jak zvýšit obsah sekundárních metabolitů v rostlinných explantátových kulturách, jejichž produkce je zpravidla nižší než u intaktních rostlin. Problémem však je najít vhodný prekurzor a jeho správnou koncentraci, aby na kulturu nepůsobil toxicky. [3,56]

Cílem této rigorózní práce bylo v suspenzní a kalusové kultuře *Trifolium pratense* (varieta DO 8) ověřit po aplikaci prekurzorů biosyntézy fenylpropanoidů ovlivnění produkce flavonoidů a isoflavonoidů. V současnosti roste zájem o tyto fytoestrogeny a antioxidanty. Jsou součástí řady biologicky aktivních potravních doplňků, které preventivně mohou chránit zdraví před přibývajícími zdravotními problémy způsobené životním stresem.

Explantátová kultura jetele lučního byla kultivována na médiu podle Gamborga s přídavkem 2 mg.l^{-1} 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l^{-1} 6- benzylaminopurinu, při teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Byl sledován vliv 6, 24, 48, 72 a 168hodinové aplikace fenylalaninu a kyseliny skořicové na produkci flavonoidů a isoflavonoidů. Testovaná koncentrace prekurzorů 10 mmol.l^{-1} byla zvolena na základě předchozích pokusů [52].

Z dosažených výsledků je zřejmé, že produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. přídavkem kyseliny skořicové (Tab 1, Graf 1) nebyla významně ovlivněna. Nejvyšší obsah 0,182 % byl zaznamenán po 24hodinové aplikaci, kdy oproti kontrole došlo ke zvýšení o 21,3 %. Při delším působení tohoto prekurzoru se produkce již snižovala.

Aplikace druhého testovaného prekurzoru fenylalaninu (Tab 2, Graf 1) úspěšná byla. S výjimkou 24hodinového působení došlo ve všech sledovaných časových intervalech k statisticky významnému zvýšení produkce. Maximální obsah flavonoidů (0,262 %) vyvolala 72hodinová aplikace fenylalaninu, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů o 74,7 % oproti kontrolní kultuře.

V případě kalusové kultury *Trifolium pratense* L. produkce flavonoidů nebyla významně zvýšena ani jedním z testovaných prekurzorů. Nejvyšší obsah po přidání kyseliny skořicové (0,154 %), zvýšený o 17,6 % oproti kontrole, byl zaznamenán po 48hodinovém působení. U fenylalaninu byl maximální obsah flavonoidů (0,161 %) zjištěn po 24hodinové aplikaci, kdy došlo ke zvýšení obsahu flavonoidů o 22,9 % oproti kontrolní kultuře. Delší působení prekurzorů způsobilo již snížení produkce, po 168 hodinách až pod hodnotu obsahu flavonoidů v kontrolních kulturách.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že produkci flavonoidů u obou typů sledovaných kultur lépe zvýšila aplikace fenylalaninu. Dále je zřejmé, že produkce byla významněji ovlivněna u suspenzní kultury, což může být dáno větším kontaktem buněk s použitými prekurzory biosyntézy fenylpropanoidů.

U explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) byla sledována také produkce isoflavonoidů po přidání kyseliny skořicové a fenylalaninu. Nejlepší výsledky byly dosaženy opět v suspenzní kultuře (Tab 5, Graf 3) po 72hodinovém působení fenylalaninu, tedy stejně jako v případě produkce flavonoidů. Nejvyšší obsah byl zjištěn u genistinu (0,11 %), kdy došlo ke zvýšení o 175 % oproti kontrole, dále formononetinu (0,05 %) zvýšení o 66,7 %, daidzeinu (0,04 %) zvýšení o 33,3 % a genisteinu (0,03 %) zvýšení o 200 %. Podobné výsledky byly zaznamenány také po 24hodinové aplikaci fenylalaninu bez souvislosti s produkcí u flavonoidů. Kyselina skořicová obsah isoflavonoidů ovlivnila negativně.

U kalusové kultury produkci isoflavonoidů (Tab 6, Graf 4) nejlépe zvýšila opět stejně jako v případě produkce flavonoidů 24hodinová aplikace fenylalaninu. Obsah genistinu byl stejný 0,11 % a došlo ke zvýšení o 450 % vzhledem ke kontrole.

Byla indukována produkce isoflavonoidů daidzeinu (0,04 %) formononetinu (0,03 %) a genisteinu (0,01 %), které v kontrolní kultuře nebyly zaznamenány. Kyselina skořicová pozitivně ovlivnila produkci isoflavonoidů po její 24hodinové aplikaci, tedy shodně jako v případě produkce flavonoidů suspenzní kulturou. Obsah genistinu (0,07 %) byl zvýšen o 250 % a byla vyvolána mírná produkce daidzeinu, genisteinu a formononetinu, bez záznamu v kontrolní kultuře.

Z uvedeného opět vyplývá, že na zvýšení produkce isoflavonoidů u obou typů kultur měla příznivější vliv aplikace fenylalaninu, obdobně jako u flavonoidů. Dosažené výsledky lze tedy shrnout, že v případě suspenzní kultury byl pozorovaný nejvyšší nárůst obou sledovaných sekundárních metabolitů po 72hodinové aplikaci fenylalaninu a v případě kalusové kultury po 24hodinové aplikaci.

Vliv potenciálních prekurzorů (kyseliny skořicové, fenylalaninu a tyrosinu) na produkci kumarinů byl sledován také v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Produkce kumarinů byla při kultivaci ve tmě zvýšena fenylalaninem v koncentraci 0,01 mmol.l⁻¹ a při kultivaci za stálého osvětlení v koncentracích 0,01 a 0,1 mmol.l⁻¹. Produkce kumarinů se přidavkem tyrosinu nezměnila. Kyselina skořicová působila na kulturu negativně. [56]

Obdobné výsledky byly zaznamenány také u jiných rostlinných kultur. Fenylalanin zvýšil obsah cefaelinu v médiu suspenzní kultury *Cephaelis ipecacuanha*, zatímco v buňkách nebyl nalezen. Přídavek fenylalaninu stimuloval v suspenzní kultuře *Salvia officinalis* jak růst, tak produkci kyseliny rozmarýnové. Kyselina skořicová působila toxicky na suspenzní kulturu *Podophyllum hexandrum*, fenylalanin a tyrosin sice neovlivnily růst kultury, ale produkci podofylotoxinu snížily. [56]

Kyselina skořicová byla použita také u explantátových kultur *Dionaea muscipula* a *Drosera capensis*, kde zvýšila produkci naftochinonů a flavonoidů jen nevýznamně. [57]

Lepších výsledků za použití kyseliny skořicové bylo dosaženo při pokusech s kulturami *Psoralea corylifolia*, u kterých významně vzrostlo množství furanokumarinu psoralenu, nasyntetizovaného touto kulturou. [58]

Z uvedených příkladů je zřejmé, že jednotlivé kultury se liší svou citlivostí vůči aplikovaným potenciálním prekurzorům a schopností využít je pro biosyntézu sekundárních metabolitů.

7. ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Maximální obsah flavonoidů (0,262 %) v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) vyvolala 72hodinová aplikace fenylalaninu o koncentraci 10 mmol.l^{-1} , kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů o 74,7 % oproti kontrolní kultuře.
2. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,161 %) v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) vyvolala 24hodinová aplikace fenylalaninu o koncentraci 10 mmol.l^{-1} , kdy došlo k statisticky nevýznamnému zvýšení obsahu flavonoidů o 22,9 % oproti kontrolní kultuře.
3. Z výsledků je zřejmé, že významněji produkci flavonoidů u obou typů sledovaných kultur zvýšila aplikace fenylalaninu o koncentraci 10 mmol.l^{-1} . Produkce je vyšší u suspenzní kultury, což může být dáno větším kontaktem buněk s použitými prekurzory biosyntézy fenylpropanoidů.
4. U suspenzní i kalusové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) byl sledován také vliv aplikace kyseliny skořicové a fenylalaninu na obsah isoflavonoidů. K nejvyššímu zvýšení produkce v porovnání s kontrolou došlo v obou kulturách u genistinu (shodně na 0,11 %) vlivem 72 a 24hodinové aplikace fenylalaninu 10 mmol.l^{-1} (nárůst o 175 % a 450 %).
5. Z testovaných prekurzorů biosyntézy fenylpropanoidů u sledované explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) lze kladně hodnotit přídavek fenylalaninu, neboť došlo ke zvýšení produkce flavonoidů i isoflavonoidů, v případě suspenzní kultury nejvíce po 72hodinové aplikaci a v případě kalusové kultury po 24hodinové aplikaci.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Stafford H.: Flavonoid evolution: An enzymic approach. *Plant Physiol.*, 1991; 96: 680–685.
2. http://cs.wikibooks.org/wiki/Přirodní_látky/Chemie_přirodních_látek/Přehled_přirodních_látek/Aromatické_sloučeniny_a_příbuzné_látky, 15.12.2012.
3. Harmatha J.: Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných fenylypropanoidů. *Chem. Listy*, 2005; 99: 622–632.
4. Pelter A.: *The shikimic acid pathway*, Plenum Press, New York 1986, s. 201.
5. Ferrer J. L., et al.: Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem.* 2008; 46: 356–370.
6. Adámková Š., et al.: Role L-fenylalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin. *Chem. Listy*, 2006; 100: 486 – 494.
7. Křepelová J.: Explantátová kultura *Trifolium pratense* L. Diplomová práce, UK Praha, FaF Hradec Králové, 2009.
8. Kindl H., Wöber G.: *Biochemie rostlin*, Academia, Praha 1981, s. 58, 280, 281.
9. Hwang E. I., et al.: Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 2699–2706.
10. http://en.wikipedia.org/wiki/Phenylpropanoid_biosynthesis, 6.1.2013.
11. Swain T., Harborne J. B., Van Sumere Ch. F.: *Biochemistry of Plant Phenolics*, Plenum Press, New York and London 1977, s. 93, 113.
12. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phenylalanine_ammonia_lyase.png, 4.3.2013.
13. Schwede T. F., Retey J., Schulz G. E.: Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry*, 1999; 38: 5355–5361.
14. http://en.wikipedia.org/wiki/Trans-cinnamate_4-monooxygenase, 19.2.2013.
15. http://en.wikipedia.org/wiki/4-Coumarate-CoA_ligase, 1.3.2013.

16. Tzin V., Galili G.: New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Mol. Plant*, 2010; 3: 956-972.
17. Vogt T.: Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant*, 2010; 3: 2-20.
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis>, 15.2.2013.
19. http://wikipedia.infostar.cz/a/ar/arabidopsis_thaliana.html, 15.2.2013.
20. Entus R., Poling M., Herrmann K. M.: Redox regulation of *Arabidopsis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Physiol*, 2002; 129: 1866-1871.
21. Takayuki T., et al.: Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Front. Plant Sci.*, 2013; doi: 10.3389/fpls.2013.00062.
22. Yan Y., et al.: A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell.*, 2007; 19: 2470-2483.
23. Pagnussat G. C., et al.: Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development*, 2005; 132: 603-614.
24. Healy-Fried M. L., et al.: Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 32949-32955.
25. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylalanin>, 18.2.2013.
26. Cho M., et al.: Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* identification and characterization of *Arogenate dehydratases*. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 30827-30835.
27. http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_skořicová, 26.2.2013.
28. Kasetti R. B., et al.: Cinnamic acid as one of the antidiabetic active principle(s) from the seeds of *Syzygium alternifolium*. *Food Chem. Toxicol.*, 2012; 50: 1425-1431.
29. Sova M.: Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2012; 12: 749-767.
30. Bourgaud F., et al.: Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, 2001; 161: 839-851.
31. http://cs.wikipedia.org/wiki/Jetel_lučni/ 2.5.2013

32. Kolodziejczyk-Czepas J.: Trifolium species-derived substances and extracts: Biological activity and prospects for medicinal applications. *J. Ethnopharmacol.*, 2012; 143: 16-21.
33. Zoric L., et al.: Comparative analysis of qualitative anatomical characters of *Trifolium L.* (Fabaceae) and their taxonomic implications: preliminary results. *Plant System. Evol.*, 2012; 298: 205–219.
34. Engelmann N. J., et al.: In vitro production of radiolabeled red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2009; 98: 147–156.
35. <http://menostop.sweb.cz/> 26.10.2011.
36. Van de Veijer P. H., Barentsen R.: Isoflavones from red clover (*Promensil*) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas* 2002; 45: 187-93.
37. Atkinson C., et al.: The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 79: 326-333.
38. Usui T.: Pharmaceutical Prospects of Phytoestrogens. *Endocrinol. J.*, 2006; 523: 7-20.
39. Mense S. M., et al.: Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanism of action. *Envir. Health Persp.*, 2008; 116: 426-433.
40. Bhupathy P., Haines C. D., Leinwand L. A.: Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health*, 2010; 6: 77-95.
41. Baber R.: Phytoestrogens and post reproductive health. *Maturitas*, 2010; 66: 344-349.
42. Lipovac M., et al.: The effect of red clover isoflavone supplementation over vasomotor and menopausal symptoms in postmenopausal women. *Gynecol. Endocrinol.*, 2011; 2011: 1-5.
43. Lipovac M., et al.: Improvement of postmenopausal depressive and anxiety symptoms after treatment with isoflavones derived from red clover extracts. *Maturitas*, 2010; 65: 258-261.
44. <http://www.menoflavon.cz/lekari/10.pdf> 28.2.2013.

45. Chen H-Q., et al.: *Trifolium pratense* isoflavones protect dopaminergic neurons by inhibiting microglia activation. *Chin. Pharmacol. Bull.*, 2011; 27: 390-396.
46. Malý J., Doseděl M.: Volně prodejné přípravky používané v peri- a postmenopauze. *Prakt. Lékáren.*, 2012; 8: 181-186.
47. Beck V., et al.: Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid. Biochem. Molecul. Biol.*, 2005; 94: 499-518.
48. Stárka L.: Fytoestrogenní přípravky v peri- a postmenopauze. *Interní Med.*, 2011; 13: 300-304.
49. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2009*, Grada, Praha 2009, s. 114, 1801.
50. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojiman K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 1968; 50: 151-158.
51. Kašparová M., et al.: Explant culture of *Trifolium pratense* L. *Čes. slov. Farm.*, 2006; 55: 44-47.
52. Muráriková K.: Ovlivnění produkce explantátové kultury *Trifolium pratense* L. I. Diplomová práce, UK Praha, FaF Hradec Králové, 2013.
53. De Rijke E., et al.: Natively fluorescent isoflavones exhibiting anomalous Stokes' shifts. *Anal. Chim. Acta*, 2002; 468: 3-11.
54. Klemra P., Klemrová V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Karolinum, Praha 1993, s. 30, 80.
55. Reisenauer, R.: *Metody matematické statistiky a jejich aplikace*, SNTL, Praha 1970, s. 82, 20.
56. Siatka T., Kašparová M.: Vliv prekurzorů na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica Archangelica* L. *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51: 47-50.
57. Krolicka A.: Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzym. Microb. Technol.*, 2008; 42: 216-221.
58. Parast B. M.: In vitro isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. *Plant Physiol. Biochem.*, 2011; 49: 1138-1146.

9. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakognozie

Kandidát **Mgr. Jana Křepelová**

Konzultant **PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.**

Název rigorózní práce **Produkce fenylypropanoidů v rostlinné explantátové kultuře**

Předmětem této rigorózní práce bylo sledovat ovlivnění produkce fenylypropanoidů po aplikaci prekurzorů jejich biosyntézy rostlinnou kulturou *in vitro*. Byl sledován vliv 6, 24, 48, 72 a 168 hodinového působení fenylyalaninu a kyseliny skořicové na produkci flavonoidů a isoflavonoidů v suspenzní a kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8). Koncentrace 10 mmol.l^{-1} u obou prekurzorů byla zvolena na základě předchozích pokusů. Tato kultura byla kultivována na médiu podle Gamborga s přidavkem 2 mg.l^{-1} 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg.l^{-1} 6- benzylaminopurinu, při teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a světelné periodě 16 hodin světlo/ 8 hodin tma.

Maximální obsah flavonoidů, zjištěný fotometrickým stanovením podle Českého lékopisu 2009, byl prokázán u suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (0,262 %) po 72hodinovém působení fenylyalaninu o koncentraci 10 mmol.l^{-1} a u kalusové kultury *Trifolium pratense* L. (0,161 %) po 24hodinovém působení fenylyalaninu o koncentraci 10 mmol.l^{-1} .

Maximální obsah isoflavonoidů, zjištěný metodou HPLC, byl prokázán v suspenzní i kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. u genistinu po 72 a 24 hodinovém působení fenylyalaninu 10 mmol.l^{-1} (shodně 0,11 %).

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate **Mgr. Jana Křepelová**

Consultant **PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.**

Title of Thesis **Production of phenylpropanoids in the plant explantat culture**

The aim of this Thesis was to monitor the effect on the production of phenylpropanoids after the application of the biosynthesis precursors by the plant culture *in vitro*. It was examined the effect of a 6, 24, 48, 72 and 168-hour exposure of the phenylalanine and cinnamic acid on the production of flavonoids and isoflavonoids in the suspension and calus culture *Trifolium pratense* L. (variety DO-8). The concentration of 10 mmol.l⁻¹ of both precursors was chosen on the basis of the previous experiments. This culture was cultivated on the Gamborg medium with an addition of 2 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l⁻¹ 6- benzylaminopurine, at the temperature of 25 °C and 16 hour light / 8 hour dark period.

The maximal content of the flavonoids detected by the photometric determination according to Pharmacopoeia Bohemica 2009 was demonstrated in the suspension culture *Trifolium pratense* L. (0.262 %) after the 72-hour exposure of the phenylalanine of the 10 mmol.l⁻¹ concentration and in the calus culture *Trifolium pratense* L. (0.161 %) after 24-hours exposure of the phenylalanine of the 10 mmol.l⁻¹ concentration.

The maximal content of isoflavonoids detected by a HPLC method was demonstrated in suspension and calus culture *Trifolium pratense* L. of genistin after 72 and 24-hour exposure of the phenylalanin of the 10 mmol.l⁻¹ concentration (both 0.11 %).