

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Ovlivnění produkce sekundárních látek v rostlinných kulturách *in vitro*

Mgr. Martina Janoutová

Datum zadání: 14. 11. 2012

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

Vedoucí rigorózní práce: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

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

Termín odevzdání: 23. 5. 2014

Počet stran: 72

Touto cestou bych chtěla poděkovat Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za pomoc při hledání informací a sestavování této Rigorózní práce a PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za analýzy vzorků.

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

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	<i>FAGOPYRUM ESCULENTUM L. – POHANKA OBECNÁ.....</i>	9
3.1.1	<i>Botanický popis rostliny</i>	9
3.1.2	<i>Rozšíření rostliny.....</i>	11
3.1.3	<i>Charakteristika drogy, její sběr a úprava</i>	11
3.1.4	<i>Obsahové látky Fagopyrum esculentum L.</i>	12
3.1.5	<i>Použití drogy</i>	12
3.2	FLAVONOIDY	14
3.2.1	<i>Struktura flavonoidů a jejich význam pro rostlinu</i>	14
3.2.2	<i>Chemická struktura flavonoidů.....</i>	14
3.2.3	<i>Použití flavonoidů</i>	17
3.3	EXPLANTÁTOVÉ KULTURY ROSTLIN.....	18
3.3.1	<i>Základní definice a pojmy</i>	18
3.3.2	<i>Typy rostlinných kultur in vitro</i>	18
3.3.3	<i>Kultivace explantátových kultur.....</i>	19
3.3.3.1	<i>Kultivační fáze.....</i>	19
3.3.3.1.1	<i>Kalusové kultury</i>	20
3.3.3.1.2	<i>Suspenzní kultury</i>	20
3.3.3.2	<i>Sterilizace</i>	21
3.3.3.2.1	<i>Sterilizace médií</i>	22
3.3.3.2.2	<i>Sterilizace rostlinného materiálu.....</i>	22
3.3.3.3	<i>Podmínky kultivace.....</i>	23
3.3.3.3.1	<i>Živná média (16).....</i>	23
3.3.3.3.2	<i>Fyzikální podmínky kultivace</i>	24
3.3.4	<i>Využití rostlinných kultur in vitro</i>	25
3.3.4.1	<i>Produkce sekundárních látek</i>	25
3.3.4.2	<i>Rozmnožování a šlechtění rostlin</i>	26
3.4	ELICITACE.....	28
3.4.1	<i>Princip elicitace.....</i>	28
3.4.2	<i>Elicitory</i>	28
3.4.2.1	<i>Dělení elicitorů</i>	28

3.4.2.2	Mechanismus působení elicitorů.....	29
3.4.3	Faktory ovlivňující elicitaci.....	30
3.5	ABIOTICKÝ ELICITOR	31
3.5.1	MD 680/II.....	31
3.5.1.1	Pyraziny	31
3.5.1.1.1	Pyrazinamidy	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	34
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	35
4.3	KULTURA <i>FAGOPYRUM ESCULENTUM</i> L.	35
4.3.1	Živné médium.....	36
4.3.2	Nádoby a nástroje použité při kultivaci kultur	37
4.3.3	Pasážování a kultivace.....	37
4.3.4	Elicitace kultury MD 680/II	38
4.4	STANOVENÍ OBSAHU RUTINU	38
4.4.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	38
4.4.2	Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie	39
4.4.3	Princip stanovení rutinu	39
4.4.4	Validace metody.....	40
4.4.4.1	Test způsobilosti	40
4.4.4.2	Validační parametry metody	40
4.4.5	Postup stanovení rutinu	42
4.4.5.1	HPLC analýza.....	42
4.5	KALIBRAČNÍ KŘIVKA.....	44
4.5.1	Vyhotovení kalibrační křivky	44
4.5.2	Kalibrační křivka rutinu.....	45
4.5.3	Záznam chromatogramu	46
4.6	VÝPOČET OBSAHU RUTINU	47
4.7	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	48
4.7.1	Aritmetický průměr	48
4.7.2	Směrodatná odchylka	48
4.7.3	T-test.....	49
5	VÝSLEDKY	50
5.1	TABULKY.....	50
6	GRAFY	57
7	DISKUZE	61
8	ZÁVĚR	65

9	POUŽITÁ LITERATURA	67
10	ABSTRAKT	71

1 ÚVOD

V důsledku stále se rozšiřující lidské populace dochází v dnešní době k výraznému ubývání míst pro přirozený růst a pěstování rostlin. Rovněž nastávají podmínky, které jsou nevhodné pro jejich dobré prospívání (zamoření půd, špatné ovzduší, mění se klimatické podmínky, riziko napadení škůdci).

Proto se objevují snahy, jak získávat rostliny, jejich části nebo obsahové látky jinými cestami. Patří sem pěstování rostlin v umělých podmínkách, kdy můžeme přesně nastavit požadavky, které rostlina pro svůj růst potřebuje. Další výhodou je, že se nemusí pěstovat celá rostlina, stačí určitý orgán nebo buňky. Tímto se zmenšuje i plocha pro pěstování.

Dále jsou snahy, jak zvýšit produkci obsahových látek v rostlinách, aby z co nejmenšího uměle vypěstovaného množství se získalo co nejvíce obsahových látek. A to je právě to, čím se zabývá tato Rigorózní práce.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bude zjistit vliv MD680/II (jako abiotického elicitoru) na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum*. Na základě stanovení obsahu rutinu metodou HPLC zjistit, zda MD680/II je schopen ovlivnit produkci této obsahové látky.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Fagopyrum esculentum* L. – Pohanka obecná

Čeleď Polygonaceae - Rdesnovité

3.1.1 Botanický popis rostliny

Pohanka obecná je jednoletá bylina dorůstající do výšky 50-140cm. Lodyhu má přímou, později načervenalou, nevětvenou nebo velmi málo větvenou. Dolní listy jsou řapíkaté, horní listy přisedlé, na bázi srdčité až střelovité, čepel trojúhelníkovitá. Květy jsou ve svazečcích skládající květenství a připomínající hrozny. Jednotlivé květy jsou oboupohlavní, 5tičetné, bílé či světle růžové. Plody jsou 3hranné nažky tmavě hnědé barvy. Pohanka obecná kvete od července do srpna. (1, 2, 3)

Obr. 1 *Fagopyrum esculentum* L. (4)



3.1.2 Rozšíření rostliny

Původem je pohanka obecná se severní Číny a jižní Sibíře. U nás se pěstuje, občas může zplanět. Pěstuje se od středověku, avšak první zplanění bylo zaznamenáno v roce 1872. (1, 2, 3)

3.1.3 Charakteristika drogy, její sběr a úprava

Pohanka obecná se pěstuje pro nat'. Drogou je *Fagopyrii herba*, celá nebo řezaná. Sbírá se na začátku kvetení, před vytvořením plodů. Ihned se suší.

Dle lékopisné definice je to celá nebo řezaná nat' druhu *Fagopyrum esculentum* MOENCH sbíraná v časně fázi kvetení před vytvořením plodů a ihned usušená. (4)

Obr. 3: Fagopyri herba (9)



3.1.4 Obsahové látky *Fagopyrum esculentum* L.

Dle lékopisu nať obsahuje nejméně 4% flavonoidu rutinu ($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,5-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-chromen-7-on, M_r 664,6), počítáno na vysušenou drogu. Dále obsahuje vitamíny skupiny B, vitamín E, cholin, bílkoviny, vyvážené složení aminokyselin, draslík, fosfor, hořčík, vápník a velké množství stopových prvků (železo, měď, mangan a zinek). (2, 4)

Pohanka také obsahuje alergenní proteiny, které jsou po požití schopné vyvolat astma a astmatické záchvaty, kopřivku a gastrointestinální potíže.

Polyfenoly v pohance mohou inhibovat činnost některých enzymů.

Pohanka může po požití většího množství vyvolávat fotosenzibilní reakci, tzv. fagopyrismus, za fototoxicitu je zodpovědný fagopyrin. Fagopyrismus byl rozpoznán již v roce 1833. U zvířat bylo experimentálně zjištěno, že příznaky se liší podle druhu zvířete a intenzitě a době trvání slunečního záření. Příznaky jsou různé od svědění, zarudnutí, otoků v oblasti obličeje a uší, až po křeče, ochrnutí nebo dokonce smrt. (5, 6, 7)

3.1.5 Použití drogy

Fagopyri herba se používá především pro izolaci rutinu. Rutin má ve zdravotnictví široké uplatnění, používá se při léčbě žilní lomivosti, snižuje křehkost kapilár a zvyšuje pružnost cév. Rovněž bylo zjištěno, že snižuje LDL cholesterol a má významnou schopnost zhášet volné radikály (antioxidační a antikancerogenní aktivita). V potravinářství se používá i plod. (10)

Rutin se používá v kombinaci s vitamínem C, protože potencuje jeho účinek. Na našem trhu je k dostání lék Ascorutin, ve kterém je obsažen rutin ve formě trihydrát rutosid (20 mg) a kyselina askorbová (100 mg). Ascorutin se používá při symptomatickém ovlivnění lomivosti a permeability kapilár různé etiologie, hlavně při hypovitaminóze a

avitaminóze C, při anafylaktoidní purpuře a jiných vaskulárních purpurách, při nedostatečnosti žil dolních končetin, při léčbě místních otoků dolních končetin posttraumatického a lymfatického původu, při hemoroidech. Také se používá k ovlivnění místních příznaků krvácení při diabetické retinopatii, při polycytemii, ulcerózní proktokolitidě a dalších onemocněních, kde se předpokládá pozitivní vliv přípravku. (8)

3.2 Flavonoidy

3.2.1 Struktura flavonoidů a jejich význam pro rostlinu

Flavonoidy jsou velkou a rozmanitou skupinou látek, které se nacházejí ve většině rostlin. V některých rostlinách se nalézají ve větším množství, proto jsou pro ně typické. Řadí se do skupiny sekundárních metabolitů fenolického charakteru. Základ chemické struktury tvoří aromatická nebo fenolická jádra. Obsahují jednu nebo více hydroxylových nebo methoxylových skupin. V rostlinách jsou převážně vázány ve formě glykosidů:

O – glykosidy - cukr je navázaný přes kyslík

C – glykosidy - cukr je navázaný přes uhlík.

Mohou se však vyskytovat i jako samotné aglykony.

Převážná část flavonoidů obsahuje velké množství hydroxylových skupin, díky kterým jsou rozpustné ve vodě. Tyto polyhydroxylované sloučeniny se nalézají ve vakuolách buněk. Nejčastěji se vyskytují v epidermis listů nebo mezofylu, u různých druhů rostlin se však mohou nacházet v různých částech.

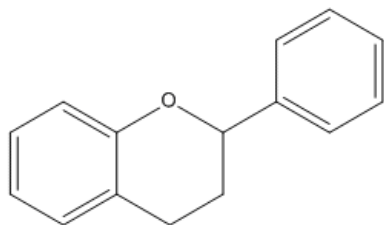
Sloučeniny s methoxylovými nebo s menším počtem hydroxylových skupin jsou lipofilnější, nalézají se v silicích a také v kutikule listů u rostlin, jejichž domovem jsou převážně suché nebo polosuché oblasti. (11, 12, 13)

Flavonoidy mají též funkci rostlinných pigmentů, které zbarvují květy rostlin od žluté, přes červenou až po modrou. Takovýmto zbarvením pak rostliny přitahují opylovače. Mezi jejich další funkce patří ochrana rostlin před UV zářením nebo napomáhají rostlině vázat dusík. (14, 15)

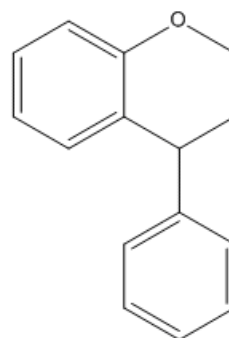
3.2.2 Chemická struktura flavonoidů

Základní chemickou strukturu flavonoidů tvoří fenylochroman. Flavonoidy rozdělujeme do tří skupin podle polohy navázaného arylu. Je-li fenylnavázan v poloze 2 (2-fenylochroman), jedná se o flavan, pokud je

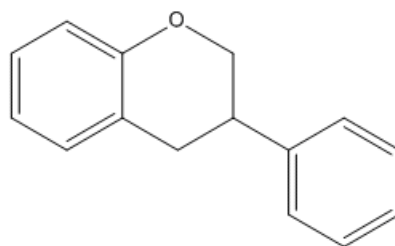
navázán v poloze 3 (3-fenylchroman) jedná se o isoflavan a pokud je fenyl navázán v poloze 4 (4-fenylchroman) hovoříme o neoflavanu. (12, 14)



flavan

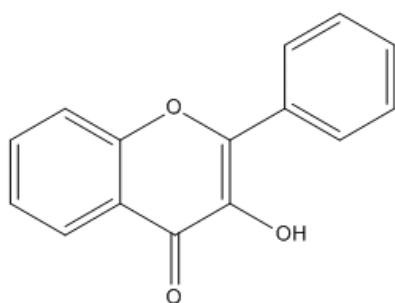


neoflavan

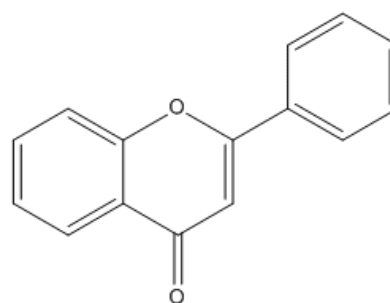


isoflavan

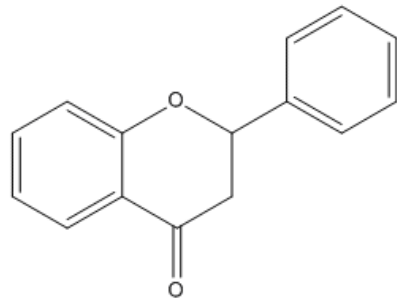
V případě oxidace pyranového kruhu vznikají některé deriváty a to flavonol, flavon, flavanon, flavan-3-ol a flavan-3,4-diol: (12)



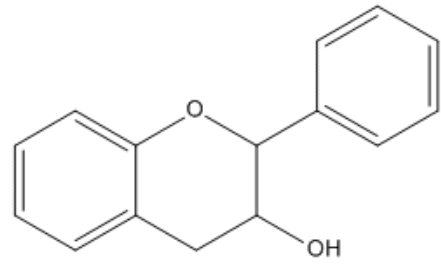
flavonol



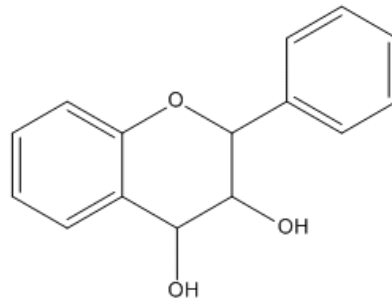
flavon



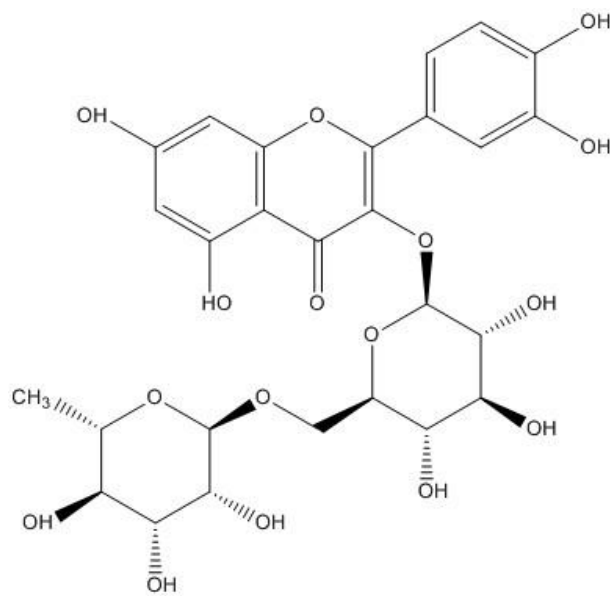
flavanon



flavan-3-ol



flavan-3,4-diol



rutin

3.2.3 Použití flavonoidů

Flavonoidy se používají především pro svou venoaktivitu, snižují permeabilitu a lomivost cév. S výhodou je lze využít při všech cévních onemocněních, jak kapilárních (prasklé cévky v očích), tak i žilních (křečové žíly), při léčbě otoků převážně dolních končetin, byla zjištěna i antihemorhagická aktivita.

U flavonoidů byl zjištěn též určitý antioxidační účinek (navazují na sebe volné radikály), z tohoto důvodu se začaly využívat i v terapii rakoviny.

Flavonoidy se často kombinují s vitamínem C a E, přičemž se využívá synergického účinku těchto vitamínů s vlastní antioxidační aktivitou flavonoidů.

Mezi další vlastnosti flavonoidů patří také antivirová, antibakteriální, antitrombotická, antialergická aktivita, mají také mírně spazmolytický účinek. (11, 12)

3.3 Explantátové kultury rostlin

3.3.1 Základní definice a pojmy

Explantátové kultury rostlin, jinak nazývané též rostlinné kultury *in vitro* jsou kultivované izolované části jednotlivých rostlin v aseptickém prostředí za uměle nastavených podmínek. (16)

- **Explantát** – oddělená část rostliny, buňka či pletivo.
- **Kultura explantátů** – pěstované explantáty *in vitro* po určitou dobu.
- **Kalus** – jsou nediferencované buňky rostlin ve shluku.
- **Primární explantát** – materiál odebraný z původní rostliny.
- **Primární kultura** – je explantát z matečné rostliny pěstovaný po určitou dobu.
- **Subkultura (pasáž)** – malá část buněk přenesená z původního na nové živné médium.
- **Subkulturace (pasážování)** – přenos malé části buněk na nové živné médium, nastává po vyčerpání všech živin z původního média nebo po takovém nárůstu buněk, které je nad únosnou míru.
- **Subkultivační interval** – je časový interval mezi pasážováním.
- **Subkultivační číslo** – udává počet opakování pasážování kultury, odvozuje se od primární kultury. (17)

3.3.2 Typy rostlinných kultur *in vitro*

Kultury rostlin *in vitro* se rozdělují do několika skupin podle morfologických charakteristik:

Orgánová kultura – malé rostlinné části nebo celé orgány kultivované na živném médiu aniž by docházelo k jakémukoliv buněčnému uvolňování. Je zachována původní struktura a všechny funkce kultury.

Tkáňová neboli buněčná kultura – malé části rostlinných tkání či buněk, nemusí být zachována původní struktura kultury, mohou být zachovány některé funkce.

Suspensní kultura – kultury buněk či jejich shluků rozptýlené v tekutém živném médiu za neustálého promíchávání a provzdušňování.

Kalusová kultura – neorganizované, rostoucí a dělicí se množství buněk. (17, 18)

Protoplastová kultura – kultura rostlinných buněk bez buněčné stěny, povrch je tvořen pouze cytoplazmatickou membránou. Tyto kultury umožňují studovat transport látek cytoplazmatickou membránou, studium biosyntéz spojených s regenerací buněčné stěny, umožňuje izolaci organel, lze do nich inkorporovat organely, molekuly nukleových kyselin a bílkovin. (20)

3.3.3 Kultivace explantátových kultur

3.3.3.1 Kultivační fáze

Kultivace explantátových kultur se rozděluje do čtyř fází:

Fáze I. – začíná výběrem matečné rostliny a získáním primární kultury.

Ze zdravé matečné rostliny povrchově sterilizované či vypěstované v aseptickém prostředí se oddělí předem daná část a přemístí se na pevné (agarové) sterilní médium. Po určitém čase se narostlý primární kalus dále rozmnožuje na novém živném médiu.

Fáze II. – fáze pomnožení primárních kultur. Opakovaným pasážováním primární kultury na nové médium se navyšuje množství explantátů v kultuře. Tato fáze se opakuje do požadovaného počtu explantátů.

Fáze III. – fáze vytvoření suspensní kultury. Suspensní kultura je vytvořena mechanickým nebo enzymovým rozvolněním kalusu a je udržována dalším pasážováním.

Fáze IV. – fáze, kdy jsou suspensní kultury udržovány v malých baňkách na třepáčkách nebo rollerech. (19)

3.3.3.1.1 Kalusové kultury

Kalusové kultury rostlin jsou tvořeny souborem nediferencovaných buněk. Lze je odvodit z buněk či komplexu buněčného pletiva jakéhokoliv orgánu (listy, stonky, kořeny,...). Kalusové kultury nelze odvozovat ze sítkovic, tracheid a skleroidů. U dvouděložných rostlin se odvozují velice dobře, u jednoděložných je odvozování kultur složitější a u dřevin nejproblematictější. Lze je neomezeně dlouho pasážovat, čímž ale mohou ztrácet původní morfologické a fyziologické charakteristiky a mohou vznikat genetické změny. Buňky nejsou schopny tvořit jednovrstevnou kulturu a nejsou schopny se uchytit ani na polotuhé podklady. Mají schopnost trvale růst na plně syntetických půdách často velmi jednoduchých. (17, 20)

3.3.3.1.2 Suspenzní kultury

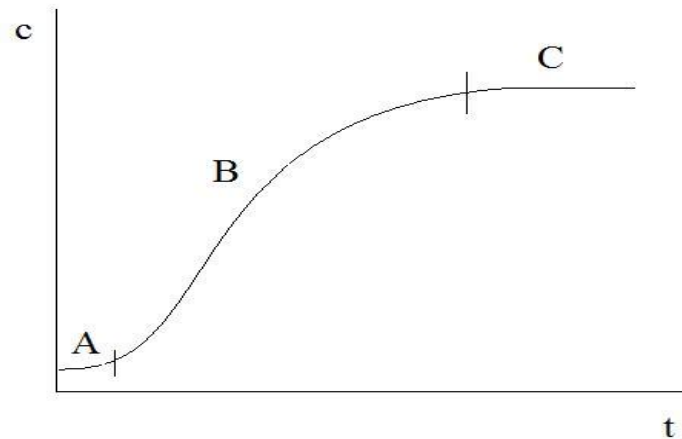
Suspenzní kultury rostlin tvoří v první řadě homogenní populace samotných buněk, ale i malé buněčné shluky. Jsou kultivované za aseptických podmínek v neustále se pohybujícím tekutém živném médiu. Každá jedna buňka je přímo v kontaktu s živným médiem, z tohoto důvodu jsou do nich snadno přístupné všechny složky živného média. Rychlý růst buněk umožňuje dobrou výměnu plynů při pohybu živného média a snadná dostupnost živin.

Kvůli rychlému nárůstu buněk dochází k rychlému úbytku živin z média, z tohoto důvodu je nutné suspenzní kultury častěji pasážovat.

Vývoj počtu buněk suspenzní kultury lze popsat růstovou křivkou. Průběh růstové křivky je charakteristický nízkým nárůstem buněk ihned po naočkování, tj. lag fáze, po lag fázi nastává exponenciální fáze, charakteristická velmi intenzivním nárůstem a nakonec stacionární fází, kde

z důvodu vyčerpání živin z média je nárůst počtu buněk minimální nebo zcela zastaven.

Obr. č. 4:



A – fáze lag

B – fáze exponenciální

C – fáze stacionární

c – koncentrace (počet buněk v ml)

t – čas (délka kultivace)

Pasážování u suspenzní kultury je nutné vždy před začátkem stacionární fáze, protože právě zde se totiž mění kultivační podmínky (složení živného média, atd.). (16)

3.3.3.2 Sterilizace

Mezi základní podmínky pro úspěšnou kultivaci explantátových kultur patří sterilizace. Tento pojem zahrnuje sterilizaci od pracovního prostředí, tj. kultivační místnosti a všechna zařízení, použité nástroje, sklo a autoklávování, přes sterilizaci živných médií a rostlinného materiálu až po sterilní práci v boxu. (16)

3.3.3.2.1 Sterilizace médií

Pro sterilizaci živných médií se používá několik metod, nejčastěji autoklávování nebo filtrace, v menší míře se ke sterilizaci médií využívá ultrazvuk či ozáření nebo použití chemických látek.

Sterilizace médií autoklávováním je sterilizace horkou parou při 121°C a tlaku 100 kPa nejčastěji po dobu 15 – 20 minut. Je prováděna v zařízení, které se nazývá autokláv. Provádí se v nádobách ze skla, které jsou uzavřené alobalem, v méně případech vatou či plastem

Sterilizace živných médií filtrací se provádí přes speciální membránové filtry, u kterých velikost pórů nepřesahuje 0,2 µm. Používá se u termolabilních médií, tj. média obsahující komponenty jako například proteiny, vitamíny, některé cukry, aminokyseliny... (16)

3.3.3.2.2 Sterilizace rostlinného materiálu

Abychom získali primární kulturu je zapotřebí mít sterilní materiál, který lze získat pomocí předem daných sterilizačních postupů. Zde není možné využít sterilizaci pomocí vysoké teploty, protože by se rostlinný materiál poškodil, proto se používá sterilizace předem stanovenými roztoky dezinfekcí, které sice usmrtí bakterie a plísně, ale nepoškozují rostlinné pletivo.

Nejčastější postup této sterilizace zahrnuje omytí explantátu v roztoku detergentu (Tween, Jar), následuje opláchnutí vodou po dobu 10 – 30 minut, vložení explantátu do roztoku dezinfekce, vyjmutí materiálu z roztoku dezinfekce a omytí alespoň 3x pomocí sterilní destilované vody. Toto vše probíhá za sterilních podmínek. (16)

3.3.3.3 Podmínky kultivace

K růstu kultury *in vitro* je nezbytné nastavit vhodné podmínky kultivace. Produkci sekundárních metabolitů lze pozměňovat různým upravováním těchto podmínek.

3.3.3.3.1 Živná média (16)

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivnění růstu a morfogeneze explantátových kultur rostlin je složení živného média.

Běžně užívaná média obsahují v podstatě tyto složky: makroelementy, mikroelementy, sacharidy, aminokyseliny, vitamíny, růstové regulátory, jiné organické složky a destilovanou vodu. Tuhá média obsahují navíc zpevňující složku.

Makroelementy – jsou tvořeny několika nejdůležitějšími prvky, mezi něž patří fosfor, dusík, draslík, hořčík, vápník a síra, jsou přidávány ve formě solí. Koncentrace se volí v závislosti na požadavcích rostlinného druhu.

Mikroelementy – mezi ně se řadí zinek a železo, oba v chelátové formě, bor, mangan, molybden a měď, občas se může přidávat i jod, kobalt, chlor a sodík.

Zdroj uhlíku – nejvíce používaným zdrojem uhlíku je disacharid sacharóza, v některých případech lze sacharózu nahradit monosacharidem (glukóza nebo fruktóza).

Vitamíny – vystupují jako katalyzátory v mnoha metabolických procesech, ve většině případů jsou důležitým faktorem pro růst. K nejvíce využívaným vitamínům patří kyselina nikotinová, thiamin, myo-inositol a pyridoxin. V určitých případech se do kultivačních médií může přidat kyselina askorbová, biotin, kyselina panthotenová, riboflavin, kyselina listová apod.

Zdroj dusíku – zdrojem dusíku jsou nejčastěji aminokyseliny. Rostlinné buňky jsou sice samy schopny vytvářet si důležité aminokyseliny, ale přidavek některých aminokyselin do živného média může zvyšovat jejich růst. Zdroj dusíku se nejčastěji dodává v organické formě a to proto, že rostlina je daleko lépe schopna využít formu organickou než anorganickou.

Mezi používané zdroje dusíku patří L-glutamin, kasein hydrolyzát, L-asparagin, adenin a glycin. Správná koncentrace musí být vždy dodržena, protože vysoká koncentrace aminokyselin v médiu může způsobit zastavení růstu.

Růstové regulátory – se nejčastěji dělí do čtyř základních skupin:

- auxiny - kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4 - D) a kyselina naftyloctová (NAA).
- cytokiny - benzyladenin (BA), benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (2IP či IPA), zeatin či furfurylaminopurin (kinetin)
- gibereliny
- kyselina abscisová.

Je nutné dodržet nejen jejich přesné koncentrace, ale i jejich určitý poměr.

Nedefinované organické složky médií – lze je užít ke stimulaci růstu, ale jsou problematické z hlediska jejich nedefinovaného složení. K nejčastěji používaným patří protein (kasein) hydrolyzát, kvasniční extrakt, kokosové mléko, extrakt z rajčatové či pomerančové šťávy, banánový extrakt a sladový extrakt.

Látky zpevňující médium – mezi nejčastěji využívané patří agar, který se rozpouští ve vodě a začíná tuhnut již při 45°C, proto nemění své vlastnosti při běžné kultivační teplotě. Je taky výhodný z toho důvodu, že nereaguje s dalšími součástmi média, není rozkladatelný rostlinnými enzymy a tuhost můžeme měnit, podle jeho použité koncentrace.

Destilovaná voda – používá se destilovaná voda vysoké kvality (prostá organických nečistot, plynů a pyrogenů).

3.3.3.2 Fyzikální podmínky kultivace

Správné nastavení fyzikálních podmínek kultivace jsou důležité jak pro růst explantátové kultury, tak i pro tvorbu sekundárních metabolitů. Mezi základní fyzikální podmínky patří: (17)

Světlo – změna biosyntézy a produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách je závislá na délce osvětlení. Je proto nezbytné zvolit pro kultivaci vhodný poměr světla a tmy. U použitého osvětlení je důležitá jak kvantita, tak i kvalita světla. (17)

Teplota při kultivaci – je nastavena empiricky kolem 25°C. Příliš nízká teplota zastavuje růst a metabolické pochody, vysoká teplota naopak může poškozovat buňky. (17)

pH živného média – nejčastěji se pH nastavuje v rozmezí 5,5 – 6,0, určité kultury požadují pH 6,0 – 7,0. Hodnotu pH lze upravit podle potřeby buď přidáním kyseliny chlorovodíkové, nebo hydroxidu draselného. (16)

Vlhkost vzduchu – udržuje se v rozmezí 20 – 98% podle požadavků jednotlivých druhů rostlin.

3.3.4 Využití rostlinných kultur *in vitro*

Rostlinné kultury *in vitro* jsou využívány v mnoha biologických oborech, které se zabývají studiem rostlin. Lze je použít k produkci sekundárních metabolitů, šlechtění a ozdravování rostlin či rozmnožování. (16)

3.3.4.1 Produkce sekundárních látek

Rostliny jsou schopné produkovat rozličné množství sekundárních metabolitů. Tyto sekundární metabolity mají uplatnění v různých odvětvích (farmacie, kosmetický průmysl, zemědělství a potravinářství). (16)

Sekundární metabolity se získávají dvěma způsoby, buď přímo z intaktní rostliny, nebo chemickou syntézou. Oba způsoby však mají řadu problémů. Příkladem mohou být zhoršující se podmínky pro pěstování, nesprávný postup při sušení a skladování, závislost produkce obsahových látek na klimatu, vznik nežádoucích izomerů velmi drahé a složité chemické syntézy. Z těchto důvodů se rozvíjí snaha o využívání explantátových kultur rostlin. (16)

Používání explantátových kultur má oproti klasickému získávání sekundárních metabolitů mnoho výhod. Patří k nim:

- a) syntéza metabolitů probíhá za přísně definovaných umělých podmínek, které nejsou závislé na půdních a klimatických poměrech, proto může probíhat nepřetržitě po celý rok. (16, 19)
- b) syntéza sekundárních metabolitů není narušována vlivem biologických faktorů (mikroorganismy, hmyz), které mění jejich produkci. (16)
- c) kultury s vyšší produkcí obsahových látek lze vyselektovat. (16)
- d) automatizací regulace metabolických procesů a růstu můžeme docílit snížení výrobní ceny, a zároveň zvýšit produkci sekundárních metabolitů. (16)
- e) změnou metabolických dějů v explantátových kulturách jsme schopni docílit produkce sekundárních metabolitů, které rostlina běžně neprodukuje. (19)

3.3.4.2 Rozmnožování a šlechtění rostlin

V oboru rozmnožování a šlechtění rostlin mají rostlinné kultury *in vitro* velmi široké využití: (16, 19)

- a) kulturu lze odvodit z jakékoliv rostlinné části, stačí i velmi malé množství a není požadován velký prostor na pěstování.
- b) pěstování probíhá za sterilních podmínek, kultury nejsou napadány mikrobiálními a virovými nákazami.
- c) množení rostlin je zcela nezávislé na klimatických podmínkách, a proto je možné po celý rok.
- d) u kultur není nutná žádná speciální péče (pletí, chemické ošetřování, zálivka,...)
- e) díky možnosti nastavení různých podmínek lze rozmnožovat i ty rostlinné druhy, které se klasickými metodami množí buď příliš pomalu, nebo se množit nedají vůbec.
- f) při hybridizaci se pomocí kultivace izolovaných embrií dá překonat přirozená bariéra taxonomicky vzdálených druhů rostlin.
- g) díky řízené fúzi protoplastů je umožněna tvorba úplně nových hybridů.

- h) lze regulovat oplození, dále pomocí kultivace prašníků a mikrospor, lze získat haploidy.
- i) v explantátových kulturách lze navodit genové a genomové mutace a poté tyto kultury vyselektovat z regenerovaných rostlin.
- j) modifikování rostlinného genomu včleněním odlišného genetického materiálu.

3.4 Elicitace

3.4.1 Princip elicitace

Princip elicitace je elicitorem (signálem) indukovaná genová exprese, která následně vede ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů. Může probíhat jak v samotných rostlinách, tak v rostlinných kulturách *in vitro*. (21)

3.4.2 Elicitory

Jsou definovány jako nepříznivé podmínky prostředí, na něž rostliny reagují (buď aktivací enzymů v pletivech, nebo zvýšením syntézy těchto enzymů), mohou být různého původu. Elicitory jako stresové faktory pro rostliny tedy indukují obrannou reakci buněk, která je založena na produkci sekundárních látek. (20)

3.4.2.1 Dělení elicitorů

Elicitory lze dělit podle původu do dvou skupin (20):

Biotické – látky, které jsou získány z živého organismu (houby, bakterie, viry), nebo látky, které vznikly při spoluúčasti tohoto organismu.

Abiotické – látky bez biologického původu, nepocházející z živého organismu, do této skupiny se řadí:

- sucho
- extrémní teploty
- toxické látky
- nadměrné osvětlení
- hypertonický roztok
- změny pH
- UV záření

- ultrazvuk
- ionty těžkých kovů

3.4.2.2 Mechanismus působení elicitorů

Aktivací vhodných genů působí elicitory v rostlinách jako spouštěče obranných mechanismů. Genová aktivita je ovlivněna nepřímo tzv. druhými posly (přenašeči signálů).

Rozlišují se dva různé typy poslů:

- cesta cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP)
- cesta fosfoinositidová

Tyto cesty jsou aktivovány navázáním biotického stresoru na receptor v buněčné membráně.

V adenosinmonofosfátové cestě je měněn adenosintrifosfát (ATP) na cAMP, pomocí adenylátcyklázy, na kterou se přenese strukturní změna receptoru díky guanosintrifosfát - vážícímu proteinu, tj. G - proteinu.

Ve fosfoinositidové cestě po navázání elicitoru dochází k rozštěpení membránového lipidu fosfatidylinositol – 4,5 – bisfosfátu (PIP₂) enzymem fosfolipázou C na dvě signální molekuly inositol – **1,4,5 – trifosfát (IP₃)** a **diacylglycerol (DAG)**. Inositol – 1,4,5 – trifosfát přechází do cytoplazmy a diacylglycerol zůstane v membráně.

Druzí poslové vyvolávají změnu fosforylace proteinů. Fosforylace je spuštěna aktivací proteinkináz (cAMP, DAG) – přímá cesta, na kterou nasedá exprese genů, nebo nepřímo, kdy se uvolní vápenaté ionty po navázání na receptor, který se nachází v endoplazmatickém retikulu. Jako následný přenašeč signálu poté vystupují vápenaté ionty. Vápenaté ionty se navážou na kalmodulin – specifická bílkovina a tím vzniká aktivní komplex se schopností aktivovat proteinkinázu. Tímto se spouští exprese genů.

Další způsob jak přenést signál a aktivovat genovou expresi je vytvoření superoxidu popřípadě jiných aktivních forem kyslíku. Tvorba superoxidu je velmi často používaný způsob a velmi rychlý způsob přenosu signálu. Aktivní formy kyslíku představují oba způsoby aktivace, jak přímý, tak i nepřímý. Peroxidací membránových lipidů v buňkách vyvolávají

zvýšenou produkci stresorů (např. kyselina jasmínová) a ty pak ovlivňují transkripci genů.

Abiotické elicitory jsou nepřímé stresory (nenaváží se na receptor). Peroxidací membránových lipidů zvýší propustnost pro vápenaté ionty, které vyvolají expresi genů. (21)

3.4.3 Faktory ovlivňující elicítaci

Faktory ovlivňující elicítaci mají vliv jak na samotnou rostlinnou kulturu *in vitro*, tak i na produkci sekundárních látek. Patří mezi ně:

Koncentrace elicitoru – stanovuje se empiricky, ovlivňuje intenzitu odpovědi

Specifita elicitoru – sekundární metabolismus více rostlinných kultur *in vitro* může ovlivňovat jeden elicitor

Doba působení elicitoru – stanovuje se empiricky, ovlivňuje aktivitu enzymů

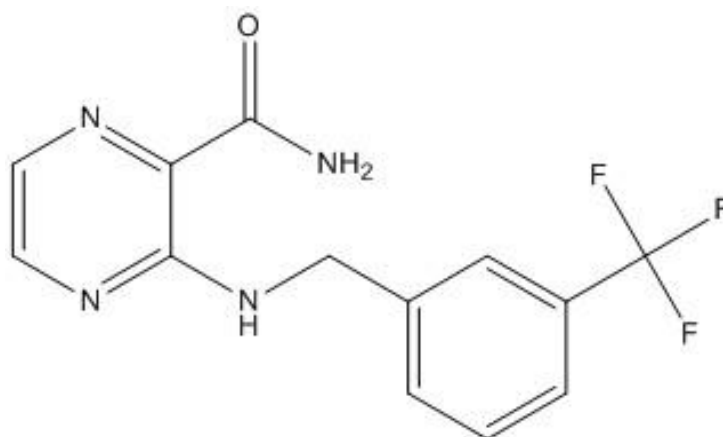
Načasování elicítace – pro dostatečnou odpověď je jako nejvhodnější doba pro působení elicitoru exponenciální fáze, v této fázi je nejaktivnější růst a aktivita enzymů

Podmínky kultivace – složení kultivačního média, teplota, osvětlení

Stáří explantátové kultury (22)

3.5 Abiotický elicitor

3.5.1 MD 680/II



MD 680/II, chemickým vzorcem 3-([3-(trifluoromethyl)benzyl]amino)pyrazine-2-carboxamide, je nový druh antituberkulotika nasyntetizovaného na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Její molekulový vzorec je $C_{13}H_{11}F_3N_4O$ a molekulová hmotnost 296,2478496. Tato sloučenina je odvozena od pyrazinamidu, který je svojí malou molekulou a unikátními biologickými a chemickými vlastnostmi velmi vhodný pro úpravy. (23)

3.5.1.1 Pyraziny

Pyrazin, 1,2-diazin, je vysoce symetrická molekula, slabě aromatická, svými vlastnostmi se blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů. V přírodě se pyraziny vyskytují v relativně malých množstvích, často jsou to těžké a dost nestálé molekuly. Z tohoto důvodu byl počet známých derivátů velmi malý, identifikace těchto sloučenin se zlepšila po zavedení HPLC a hmotnostní spektrometrie.

Deriváty pyrazinu v přírodě mají u rostlin a živočichů převážně úlohu atraktantů, feromonů nebo signálních látek. Deriváty pyrazinů hrají významnou roli v potravinářství, kde ovlivňují organoleptické vlastnosti.

Pro lidský organismus jsou důležité dihydropyraziny, které plní velmi důležité funkce (indukce apoptózy, aktivace mitogenem aktivované proteinkinazy, indukce mutageneze).

Velké množství alkyl- a vinylpyrazinů bylo identifikováno v kávových a sójových bobech, vařeném hovězím mase, smažených burských oříšcích, sýrech, pivu a vínu.

Pyrazinové deriváty mají také velký podíl na chuti a vůni vařených a pečených brambor a chlebové kůrky.

Tetramethylpyrazin (ligustrazin) izolovaný z čínské rostliny *Ligusticum wallichii* a *Jatropha podagrica* je účinná substance drogy, která se používá v tradiční čínské medicíně (léčba srdečního a mozkového infarktu – vazodilatační a antiagregační účinek).

Flutimid, metabolit izolovaný z plísně *Delitshia coferaspora*, je pyrazinový derivát s významnou protivirovou aktivitou (inhibice endonukleazy).

Významné potenciální protinádorové látky jsou i pyrazinové deriváty (pyrazin substituovaný steroidem) získané z mořských živočichů a rostlin:

cefalostatin – z mořských červů *Cephalodiscus gilchristi*

ritterazin – z *Ritterella tokioka*

Synteticky připravené pyraziny mají též velkou řadu farmakologických účinků (chemoterapeutika, antituberkulotika, diuretika, hypolipidemika, fungicida, perorální antidiabetika, hypnotika, antineoplastika, antivirotika)
(24)

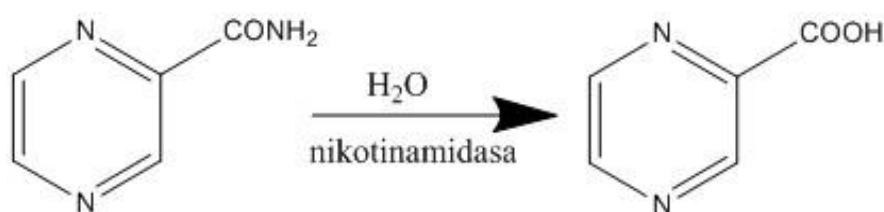
3.5.1.1.1 Pyrazinamidy

Pyrazinamidy představovaly druhou linii cílené studie metabolismu mykobakterií. Pyrazinamid je pyrazinový analog již dříve objeveného

antituberkuloticky účinného nikotinamidu, je produktem úsilí vyvinutého při hledání antimetabolitu nikotinamidu.

Modifikace této molekuly se ubírala převážně neúspěšnými cestami, neosvědčila se náhrada pyrazinového jádra jiným heteroaromatickým kruhem, pozitivní výsledky přinesly až substituce pyrazinového jádra (alkylace, halogenace). Největší význam při hledání aktivnější molekuly má karboxamidová skupina, tímto vznikl reverzibilní derivát pyrazin-2-karboxylové kyseliny (proléčivo).

Mechanismus účinku pyrazinamidu spočívá v inhibici nikotinamidazy, jež je prekurzorem vznikající uvnitř tuberkulotické buňky. Účinným metabolitem je pyrazin-2-karboxylová kyselina.



pyrazinamid

pyrazinkarboxylová kyselina

Pyrazinamid je vhodný hlavně v iniciální fázi léčby tuberkulózy (rychle usmrcuje replikující se a částečně nereplikující se kmeny *Mycobacterium tuberculosis*) nebo při postižení centrální nervové soustavy (velmi dobře proniká), v kombinaci s isoniazidem a rifampicinem. Je indikován při terapii plicní i mimoplicní tuberkulózy v kombinaci s dalšími antituberkulotiky. Pyrazinamid je účinný proti *M. tuberculosis*, *M. xenopi* a *M. avium*. (25)

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje

- laminární box Fatran, Výrobné družstvo Pokrok, Slovenská republika
- laboratorní analytické váhy A 200 S, Sartorius, Německo
- horkovzdušný sterilizátor SVS/1, Chirana, Česká republika
- autokláv PS 20 A, Chirana, Česká republika
- ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100 H, Bandelin, Německo
- ultrazvuková lázeň Sonorex RK 255 H, Bandelin, Německo
- vodní lázeň typ 1042, Gesellschaft für Labortechnik, Německo
- laboratorní třepačka Unimax 2010, Heidolph instruments, Německo
- mikrofiltry Corning NY 14831(velikost pórů 0,2 μ m), Německo

Kapalinový chromatograf

- kolona LiChroCART 250x4mm, sorbent LiChrospher 5 μ m
- autosampler Jasco AS-2055, Japonsko
- čerpadlo Jasco PU-2089, Japonsko
- diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko
- těsnění k vialkám, Labicom s.r.o., Česká republika
- vialky, Labicom s.r.o Olomouc, Česká republika

4.2 Použité chemikálie

- destilovaná voda, Katedra analytické chemie Faf HK UK, Česká republika
- Ajatin, Profarma-Produkt s.r.o., Česká republika
- methanol HPLC Grade, Merk, Německo
- Methylalkohol p.a., Penta, Česká republika
- superčistá voda, Katedra analytické chemie Faf HK UK, Česká republika
- standard: rutin Sigma-Aldrich
- superčistá voda, Katedra analytické chemie Faf HK UK, Česká republika
- MD 680/II –
3-{{[3-(trifluoromethyl)benzyl]amino}pyrazine-2-carboxamide
- HPLC: mobilní fáze:
acetonitril – čistota pro HPLC, Gradient Grade, Lachema Neratovice
kyselina fosforečná – čistota pro analýzy (PA), Penta Chrudim

4.3 Kultura *Fagopyrum esculentum* L.

V této rigorózní práci byla k pokusům použita kalusová a suspenzní kultura *Fagopyrum esculentum* L.. Kalusová kultura byla odvozena z klíčnicí rostliny *Fagopyrum esculentum* L. a to z její kořenové části. Suspenzní kultura byla získána mechanickým rozvolněním rozpadavé kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* L.

K pokusům byla použita kalusová kultura *Fagopyrum esculentum* L., pasáž č. 22 – 24 a suspenzní kultura *Fagopyrum esculentum* L., pasáž č. 25 - 27.

4.3.1 Živné médium

Jako živné médium pro kultivaci kalusové i suspenzní kultury *Fagopyrum esculentum* L. bylo použito médium dle Murashigeho a Skooga s obsahem (2,4-D) jako růstového regulátoru.

Složení živného média: (26)

CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,0252 g/l
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0252 mg/l
H ₃ BO ₃	6,2 g/l
KI	0,83 g/l
MnSO ₄ . H ₂ O	16,9 g/l
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25 g/l
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	11,5 g/l
CaCl ₂	3,325 g/l
KNO ₃	19,0 g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3,7 g/l
NH ₄ NO ₃	16,5 g/l
KH ₂ PO ₄	1,7 g/l
kyselina nikotinová	0,5 g/l
pyridoxin hydrochlorid	0,5 g/l
thiamin hydrochlorid	0,1 g/l
glycin	2 g/l
Myo-inositol	0,1 g/l
hydrolyzát kaseinu	1,0 g/l
sacharóza	30,0 g/l

Všechny složky živného média byly zváženy na analytických vahách a rozpuštěny postupně v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 1000 ml.

K takto připravenému živnému médiu byl přidán ještě růstový regulátor 2,4-D v lihu o koncentraci 0,025g/25ml.

Baňka byla poté doplněna destilovanou vodou po značku.

4.3.2 Nádoby a nástroje použité při kultivaci kultur

Na kultivaci kultur (kalusové i suspenzní) byly využity Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml. Použité baňky byly vyrobené z varného skla Sial, odolné jak vůči působení chemikálií, tak i působení velkých výkyvů teplot.

U kalusových kultur byly při kultivaci do Erlenmeyerových baněk dány můstky z filtračního papíru a bylo přilito 30 ml živného média. U suspenzní kultury bylo při kultivaci do Erlenmeyerových baněk vlito pouze 30 ml živného média. U takto připravených baněk byla hrdla překryta alobalem a baňky byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při 121°C a tlaku 100 kPa.

Pinzety používané při pasážování, byly pečlivě umyty, poté ošetřeny 96% ethanolem, zabaleny do alobalu, takto připravené pinzety byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru 2 hodiny při 200°C.

4.3.3 Pasážování a kultivace

Každá kultivační baňka zakrytá alobalem byla před manipulací pečlivě otřena buničinou namočenou v 96% ethanolu.

Jakákoliv manipulace s kulturou (odvození a pasážování) se provádělo v laminárním boxu, jenž byl nejprve vymyt roztokem Ajatinu v koncentraci 1:10 a poté vyzářen minimálně po dobu 1 hodiny germicidní zářivkou. Při práci byly vždy dodrženy aseptické podmínky.

Pasážování se provádělo 6. týden kultivace. Část narostlého kalusu se přeneslo na můstek z filtračního papíru do Erlenmeyerových baněk, které byly předem naplněny živným médiem. Takto připravené baňky byly opět uzavřeny alobalem a navraceny do kultivační místnosti. Kultivace probíhala za světelného režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma za teploty 25°C. Z narostlých kalusů byla zhotovena, mechanickým rozvolněním, suspenzní kultura v Erlenmeyerových baňkách obsahující nové živné médium. Baňky byly taktéž zakryty alobalem a kultivovány opět za identických podmínek jako kultury kalusové s tím, že suspenzní kultury jsou navíc upevněny v laboratorní třepačce (150 ot/min).

4.3.4 Elicitace kultury MD 680/II

K elicitaci kalusové i suspenzní kultury *Fagopyrum esculentum* L. byla jako abiotický elicitor použita sloučenina MD 680/II.

Jednotlivé baňky s kalusovou i suspenzní kulturou *Fagopyrum esculentum* L. byly vystaveny působení chemické sloučeniny o koncentracích $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Kalusové i suspenzní kultury byly po elicitaci kultivovány při teplotě 25°C a za světelného režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma, suspenzní kultury navíc na laboratorní třepačce (150 ot/min).

Vzorky kalusové i suspenzní kultury *Fagopyrum esculentum* L. byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách po vystavení vlivu elicitoru. Odebrané vzorky kalusové kultury byly vyňaty pinzetou na filtrační papír a následně usušeny při pokojové teplotě. Odebrané vzorky ze suspenzní kultury byly přefiltrovány a buňky zachycené na filtračním papíře se nechaly taktéž usušit za pokojové teploty. Vzorek média, který se odebíral pouze ze suspenzní kultury, byl zamražen pro následnou analýzu.

Kontrolní vzorky (bez působení elicitoru, pouze byl přidán 1 ml lihu) byly odebrány po 24 a 168 hodinách, za stejných podmínek jako vzorky elicítované.

Pro každý odběr vzorku byly použity 4 baňky.

4.4 Stanovení obsahu rutinu

4.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Neboli HPLC – High Performance Liquid Chromatography je jednou z nejrychleji se rozvíjejících analytických metod. Řadí se mezi separační metody.

Mezi hlavní přednosti HPLC patří jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, vysoká selektivita, rychlost a

citlivost stanovení. Je možná úplná automatizace. Ke stanovení je dostačující i minimální množství vzorku.

Princip HPLC je založen na dělení látek směsi mezi dvěma fázemi. Jedna fáze je nepohyblivá (stacionární) a druhá fáze je pohyblivá (mobilní). (27, 28)

4.4.2 Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří v dnešní době k nejvíce využívané separační metodě. Používá se jak ke stanovení léčiv, tak i metabolitů vznikajících při jejich rozkladu, dále pesticidů, steroidů, barviv, vitamínů, cukrů, atd. (21)

HPLC je vhodnou metodou pro stanovení rutinu v kultuře *Fagopyrum esculentum* L., HPLC je lékopisnou metodou dle ČL2009. (4)

Tato metoda byla použita pro stanovení rutinu ve studii Iwona Sergiel, Pawel Pohl a Magdalena Biesaga. (29)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla použita pro stanovení rutinu i ve studii Maria N. Irakli, Victoria F. Samanidou, Costas G. Biliaderis a Ioannis N. Papadoyannis. (30)

Dále byla použita také ve studii Maja Vogrincic, Ivan Krefl, Metka Filipic a Bojana Zegura. (31)

4.4.3 Princip stanovení rutinu

Stanovení obsahu rutinu v kultuře *Fagopyrum esculentum* L. pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

4.4.4 Validace metody

Je předem daný proces, který slouží ke zjišťování vhodnosti metody pro daný účel. Zjišťují se základní charakteristiky metody, výsledkem je, zda je metoda přesná, selektivní a správná. (32)

4.4.4.1 Test způsobilosti

Test způsobilosti analytického systému je nepostradatelnou součástí validace analytické metody. Tímto testem se zjišťuje, zda je metoda vhodná k zajištění přiměřené účinnosti. (32)

Mezi nejčastěji sledované parametry patří: (32)

- faktor symetrie
- rozlišení
- relativní retence
- kapacitní faktor
- účinnost kolony

Ve chvíli, kdy by jeden nebo více parametrů nevyhovovali, upraví se chromatografické podmínky (tj. průtoková rychlost kolonou, poměr mezi jednotlivými složkami mobilní fáze) tak, aby byla zajištěna způsobilost, ale přitom nedošlo k velké změně metody. (32)

4.4.4.2 Validační parametry metody

- **Správnost** – vyjadřuje shodu mezi naším výsledkem a správnou hodnotou, která byla získaná jinou nezávislou metodou (s ověřenou správností) nebo přípravou modelového vzorku (tj. všechny složky přípravku a přesně dané množství standardu). Správnost se vyjadřuje buď výtěžností, nebo rozdílem správné a získané hodnoty. Stanovuje se alespoň ze šesti vzorků. (32)

- **Přesnost** – je to míra shody mezi opakovaně naměřenými výsledky, stanovuje se šestkrát s jedním homogenním vzorkem. Je

vyjadřovaná jako relativní směrodatná odchylka. Podle podmínek opakování rozlišujeme:

opakovatelnost (jeden pracovník, stejný způsob, přístroj a činidla)

mezilehlá přesnost (různý pracovník, různá činidla i přístroje, jiný den, jeden vzorek, jedna laboratoř)

reprodukovatelnost (různý pracovník, různá činidla, různé přístroje, jiný den, jiná laboratoř, ale jeden vzorek). (32)

- **Selektivita** – je schopností metody změřit ve směsi různých látek správně pouze jednu látku. (32)

- **Detekční limit** – je citlivostí metody, vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, kterou je schopný přístroj již detekovat. (32)

- **Kvantitativní limit** – je citlivostí metody, udává schopnost přístroje detekovat co nejnižší koncentraci látky přijatelně správně a přesně. (32)

- **Linearita** – udává schopnost přístroje poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci zjišťované látky. (32)

- **Rozsah** – neboli koncentrační rozsah, udává rozmezí, ve kterém je metoda použitelná. (32)

- **Robustnost** – udává vliv určitých podmínek, které se mění, na výsledky analýzy, mezi tyto podmínky patří pH a složení mobilní fáze (vodné složky), teplota na koloně, rozdílnost kolon (šarže, výrobce), stabilita analyzovaných vzorků, průtoková rychlost. (32)

4.4.5 Postup stanovení rutinu

Předem vysušené vzorky buněk kalusové i suspenzní kultury (elicitované i kontrolní) byly upráškovány pomocí třenky a postupně zváženy na analytických vahách.

Z takto připravených vzorků byly následně vyrobeny extrakty pro stanovení obsahu rutinu.

Vzorky byly postupně extrahovány 10 ml 80% methanolu na vodní lázni o teplotě 60°C pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Po následném vychladnutí se vzorek zfiltraval do odměrné baňky o objemu 20ml přes chomáček vaty. Poté se ke zbytku vzorku v baňce a k chomáčku vaty přidalo 5ml 80% methanolu a vložilo se na 15 minut do ultrazvukové lázně. Opět se zfiltravalo, extrakty se spojily a doplnily po rysku, tj. na objem 20 ml 80% methanolem.

Zhruba 1,7 ml tohoto výluhu se přefiltrovalo přes mikrofiltr s velikostí pórů 0,2 µm do vialky, vialka se označila a následovala analýza na kapalinovém chromatografu. (4)

4.4.5.1 HPLC analýza

Kapalinový chromatograf:

chromatografická sestava Jasco

autosampler AS-2055

čerpadlo Jasco PU-2089

detektory MD-2015

předkolonový filtr

kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5µm) s ochrannou předkolonou

Objem nástřiku: 20 µl

Mobilní fáze: fáze A: 5% acetonitril ve vodě s přidavkem 0,15% kyseliny fosforečné ve vodě (pufr)

fáze B: 100% acetonitril

Eluční profil: eluce mobilní fáze probíhala prvních 6 minut isokraticky,
následně gradientově

0 min.	96% fáze A	4% fáze B
6 min.	96% fáze A	4% fáze B
16,5 min.	80% fáze A	20% fáze B
22 min.	65% fáze A	35% fáze B
23 min.	60% fáze A	40% fáze B

Standard: rutin

Retenční čas rutinu: 19,5 minuty

Teplota kolony: 25°C

Nastříkovaný objem: 20µl

Průtok: 1ml/minutu

Detekce: diodový detektor DAD, vlnová délka 350 nm

Udané výsledky analýzy jsou průměrem z 3 stanovení vzorků.

4.5 Kalibrační křivka

4.5.1 Vyhotovení kalibrační křivky

Roztoky byly vytvořeny rozpuštěním v methanolu, použité koncentrace:

25 mg/100 ml

12,5 mg/100 ml

6,25 mg/100 ml

3,125 mg/100 ml

Kalibrační křivka byla vyhotoveny podle rovnice:

$$y = bx + a$$

y – plocha

x – koncentrace v mg/g

a – 0

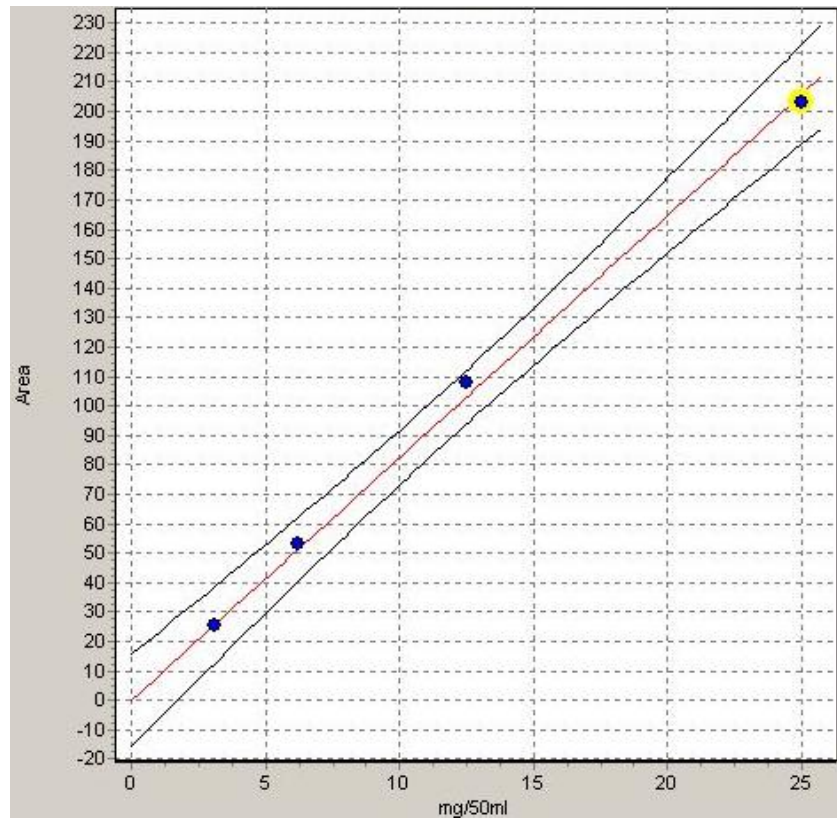
b – hodnota rutinu

4.5.2 Kalibrační křivka rutinu

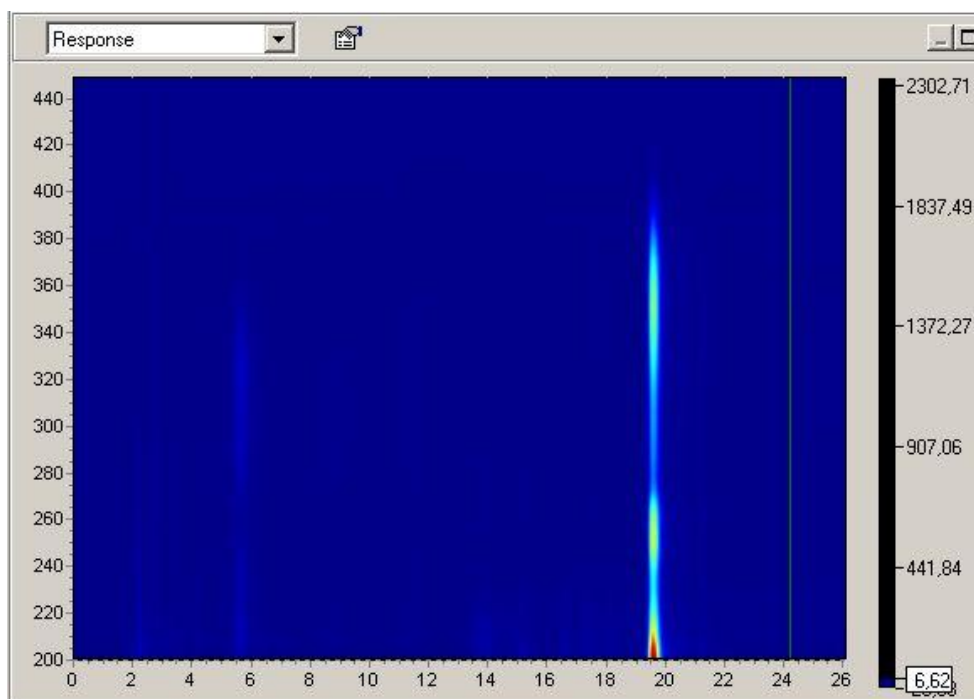
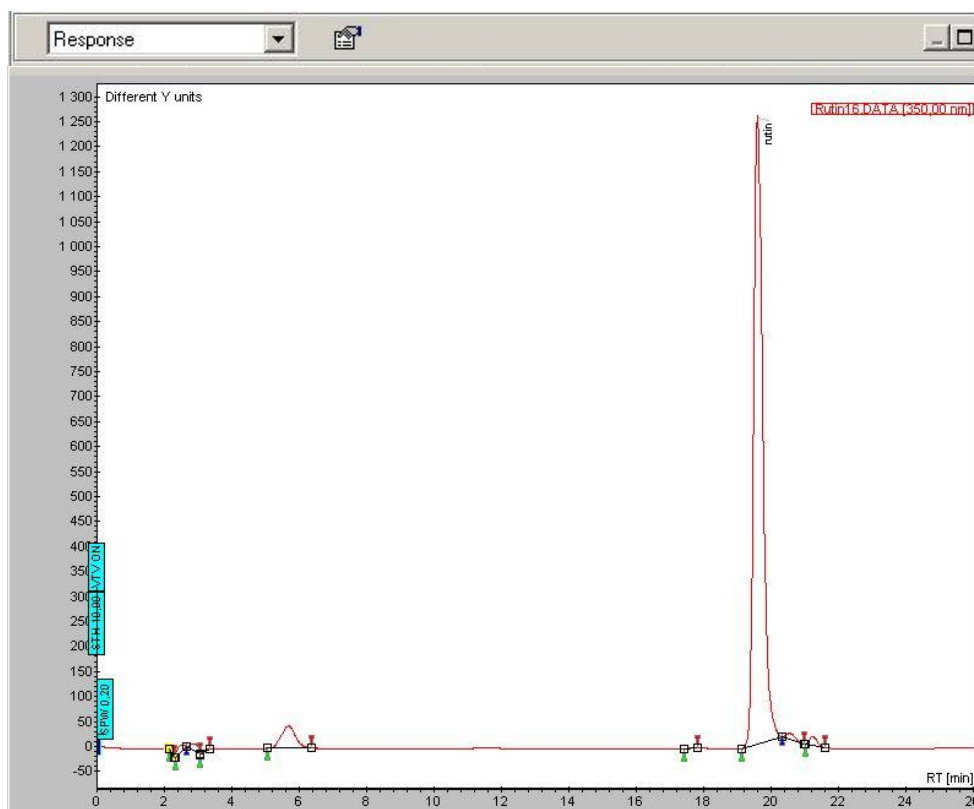
regresivní koeficient = 0,9981

a = 0

b = 8,22698



4.5.3 Záznam chromatogramu



4.6 Výpočet obsahu rutinu

Výpočet obsahu rutinu provedl software propojený s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, určil obsah plochy pod křivkou, tj. píku. Data vyhodnotil podle kalibrační křivky, jež byla sestavena podle předem naměřených píků u standardů.

Výpočet rutinu podle vzorce:

$$C = (AUC/AUC_{st}) \times C_{st}$$

C_{st} – koncentrace standardu

C – koncentrace vzorku

AUC_{st} – plocha pod křivkou standardu

AUC – plocha pod křivkou vzorku

U výpočtů byla zohledněna navážka vzorku, konečné výsledky jsou uvedeny v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$.

4.7 Statistické vyhodnocení dat

4.7.1 Aritmetický průměr

Je získaná průměrná hodnota z velkého množství opakovaných měření. Aritmetický průměr je přibližně roven reálné hodnotě.

Je počítán ze vzorce: (33)

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

\bar{x} = aritmetický průměr

x_i = jednotlivé hodnoty

n = velikost souboru

4.7.2 Směrodatná odchylka

Je nejčastěji používaná statistická charakteristika. Udává nám velikost rozptýlenosti kolem průměru u jednotlivých hodnot. (34)

Je počítána ze vzorce: (35)

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

s = směrodatná odchylka

\bar{x} = aritmetický průměr

x_i = jednotlivé hodnoty

n = rozsah souboru

4.7.3 T-test

Je jeden z nejpoužívanějších statistických parametrů. Je potřebný k ověření důležitosti rozdílů mezi určitými průměry. Značí se též jako Studentův T-test. (36)

Vzorec pro výpočet: (35)

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

T = testovací kritérium

\bar{x}_2 = aritmetický průměr pokusného souboru

\bar{x}_1 = aritmetický průměr kontrolního souboru

n_2 = počet zástupců pokusného souboru

n_1 = počet zástupců kontrolního souboru

S_2 = směrodatná odchylka pokusného souboru

S_1 = směrodatná odchylka kontrolního souboru

T náleží **t** rozdělení se stupněm volnosti (**v**), je vypočítáván ze vzorce:

$$\mathbf{v} = \mathbf{n}_1 + \mathbf{n}_2 - \mathbf{2}$$

Získaná hodnota testovacího kritéria (**t**) porovná s určitou kritickou hodnotou **t(v)_p** pro počítaný stupeň volnosti (**v**) a vybranou hladinu významnosti (**p**).

Pro tři po sobě jdoucí stanovení obsahu je dáno, že množství členů souboru zkoumaného a kontrolního souboru je vždy identický, tj. **n₁ = n₂ = 3** a množství stupňů volnosti **v = 4**. Kritická hodnota **t(v)_p** pro **p(0,05) = 2,78**. (37)

5 Výsledky

5.1 Tabulky

Tabulka č. 1: Produkce rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$) kalusovou kulturou *Fagopyrum esculentum* L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756\cdot 10^{-5}$ mol/l

Koncentrace MD680/II - $3,3756\cdot 10^{-5}$ mol/l			
Doba kultivace (hod)	Obsah rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$)	Směrodatná odchylka	T-test
6	0,040	0,005	13,8564
12	0,260	0,005	90,0666
24	0,120	0,005	41,5692
24K	0	0	0
48	0,010	0,005	3,4641
72	0,010	0,005	3,4641
168	0	0	0
168K	0,010	0,005	3,4641

K – kontrola (bez elicitoru)

Tabulka č. 2: **Produkce rutinu (mg.g⁻¹DW) kalusovou kulturou *Fagopyrum esculentum* L. elicitované MD 680/II o koncentraci 3,3756.10⁻⁴ mol/l**

Koncentrace MD680/II - 3,3756.10 ⁻⁴ mol/l			
Doba kultivace (hod)	Obsah rutinu (mg.g ⁻¹ DW)	Směrodatná odchylka	T-test
6	0,010	0,005	3,4641
12	0,010	0,005	3,4641
24	0,350	0,05	12,1244
24K	0	0	0
48	0,480	0,05	16,6277
72	0,490	0,05	16,9741
168	0,020	0,005	9,798
168K	0,060	0,005	0

K – kontrola (bez elicitoru)

Tabulka č. 3: **Produkce rutinu (mg.g⁻¹DW) kalusovou kulturou *Fagopyrum esculentum* L. elicitované MD 680/II o koncentraci 3,3756.10⁻³ mol/l**

Koncentrace MD680/II - 3,3756.10 ⁻³ mol/l			
Doba kultivace (hod)	Obsah rutinu (mg.g ⁻¹ DW)	Směrodatná odchylka	T-test
6	0	0	3,4641
12	0,320	0,05	10,6854
24	0,680	0,05	23,0943
24K	0,010	0,005	0
48	0,010	0,005	0
72	0,070	0,005	14,6969
168	1,280	0,05	43,7758
168K	0,010	0,005	0

K – kontrola (bez elicitoru)

Tabulka č. 4: **Produkce rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$) suspenzní kulturou *Fagopyrum esculentum* L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756\cdot 10^{-5}$ mol/l**

Koncentrace MD680/II - $3,3756\cdot 10^{-5}$ mol/l			
Doba kultivace (hod)	Obsah rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$)	Směrodatná odchylka	T-test
6	0,010	0,005	3,4641
12	0	0	0
24	0,010	0,005	3,4641
24K	0	0	0
48	0	0	0
72	0	0	0
168	0	0	3,4641
168K	0,010	0,005	0

K – kontrola (bez elicitoru)

Tabulka č. 5: **Produkce rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$) suspenzní kulturou *Fagopyrum esculentum* L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756\cdot 10^{-4}$ mol/l**

Koncentrace MD680/II - $3,3756\cdot 10^{-4}$ mol/l			
Doba kultivace (hod)	Obsah rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$)	Směrodatná odchylka	T-test
6	0,010	0,005	0
12	0	0	3,4641
24	0,010	0,005	0
24K	0,010	0,005	0
48	0	0	3,5641
72	0	0	3,4641
168	0,320	0,05	7,9279
168K	0,090	0,005	0

K – kontrola (bez elicitoru)

Tabulka č. 6: **Produkce rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$) suspenzní kulturou *Fagopyrum esculentum* L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756\cdot 10^{-3}$ mol/l**

Koncentrace MD680/II - $3,3756\cdot 10^{-3}$ mol/l			
Doba kultivace (hod)	Obsah rutinu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$)	Směrodatná odchylka	T-test
6	0,030	0,005	2,4495
12	0	0	0
24	0,030	0,005	2,4495
24K	0,020	0,005	0
48	0,040	0,005	4,899
72	0,040	0,005	4,899
168	0	0	0
168K	0	0	0

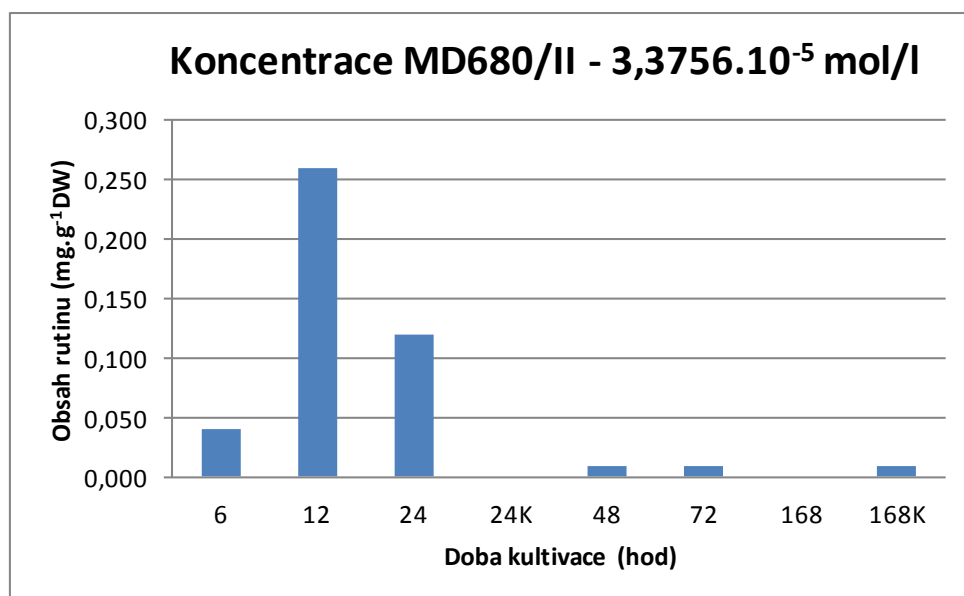
Tabulka č. 7: **Produkce rutinu (mg/100 ml) suspenzní kulturou *Fagopyrum esculentum* L. do živného média**

Obsah rutinu (mg/100ml)			
Doba kultivace (hod)	Koncentrace MD680/II		
	$3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l	$3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l	$3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l
6	0,14	0	0
12	0 (0,06)	0	0
24	0,67	0	0
24K	0 (0,02)	0	0
48	0,34	0	0
72	0,33	0	0
168	0 (0,06)	0	0
168K	0 (0,05)	0	0

K – kontrola (bez elicitoru)

6 Grafy

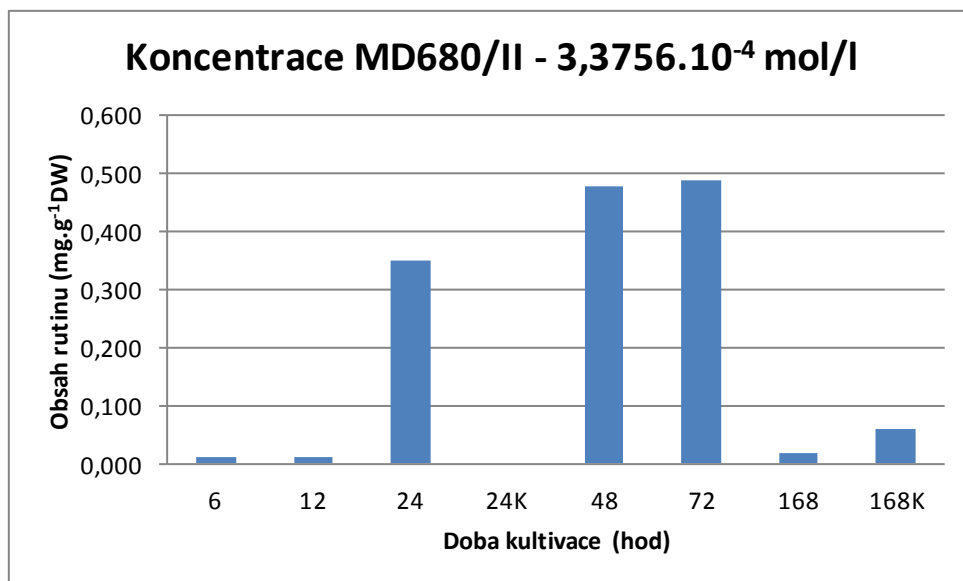
Graf č. 1: Produkce rutinu v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum*
L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l



K – kontrola (bez elicitoru)

Graf č. 2: Produkce rutinu v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum*

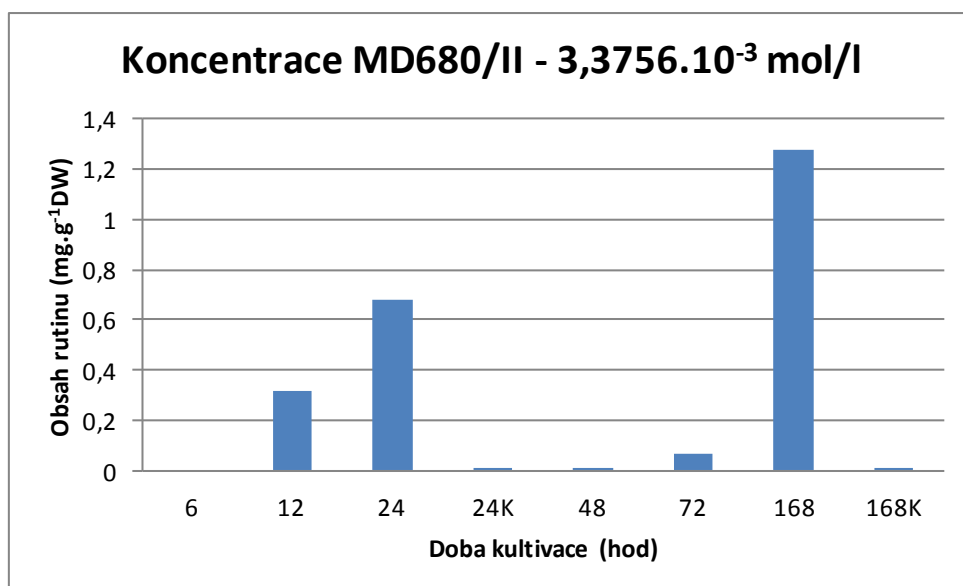
L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l



K – kontrola (bez elicitoru)

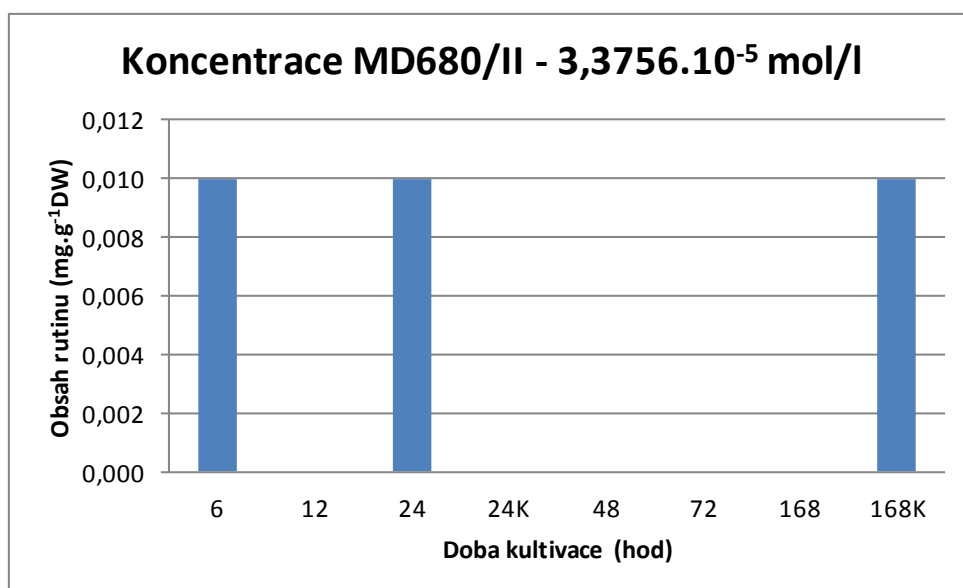
Graf č. 3: Produkce rutinu v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum*

L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l



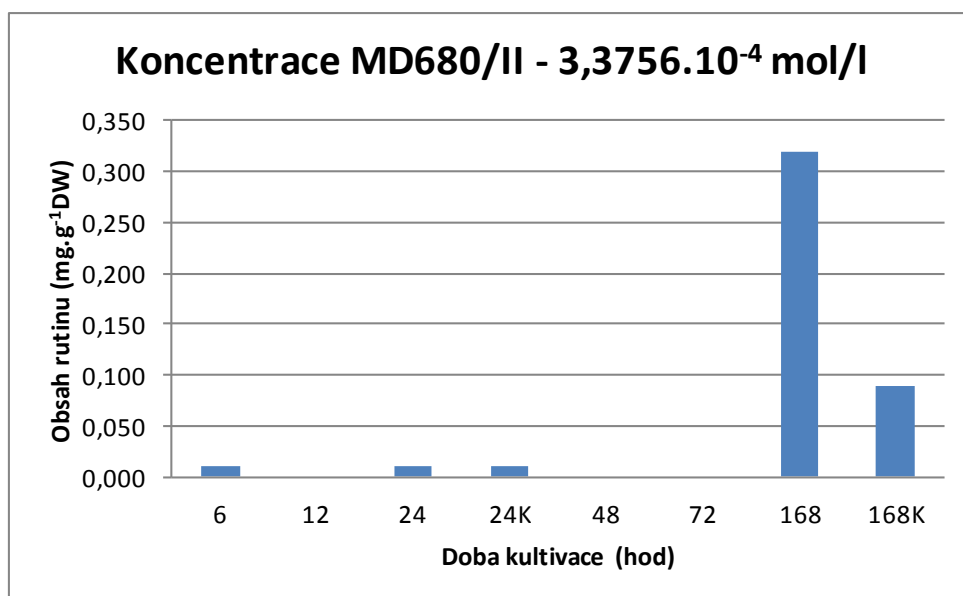
K – kontrola (bez elicitoru)

**Graf č. 4: Produkce rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum*
L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l**



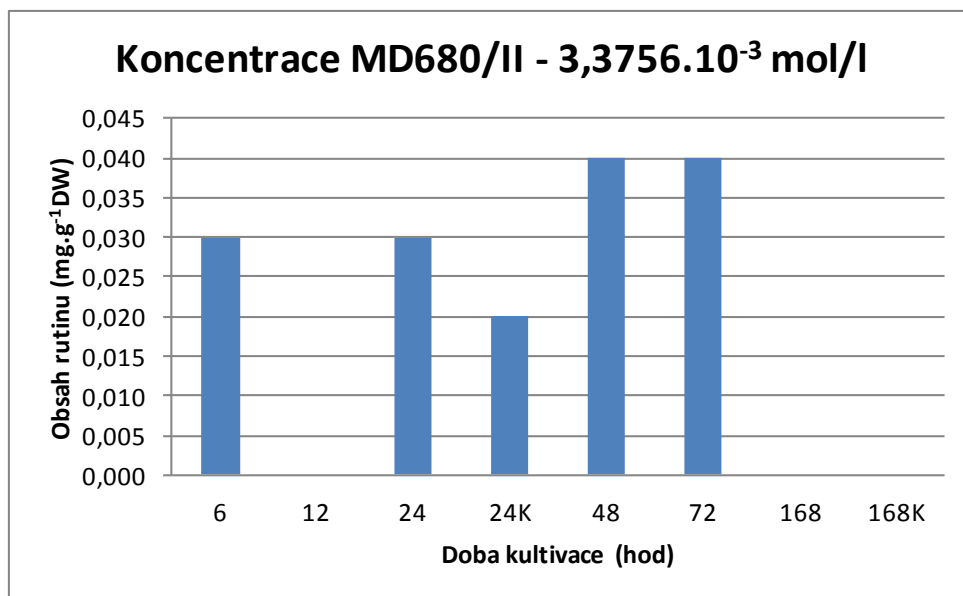
K – kontrola (bez elicitoru)

**Graf č. 5: Produkce rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum*
L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l**



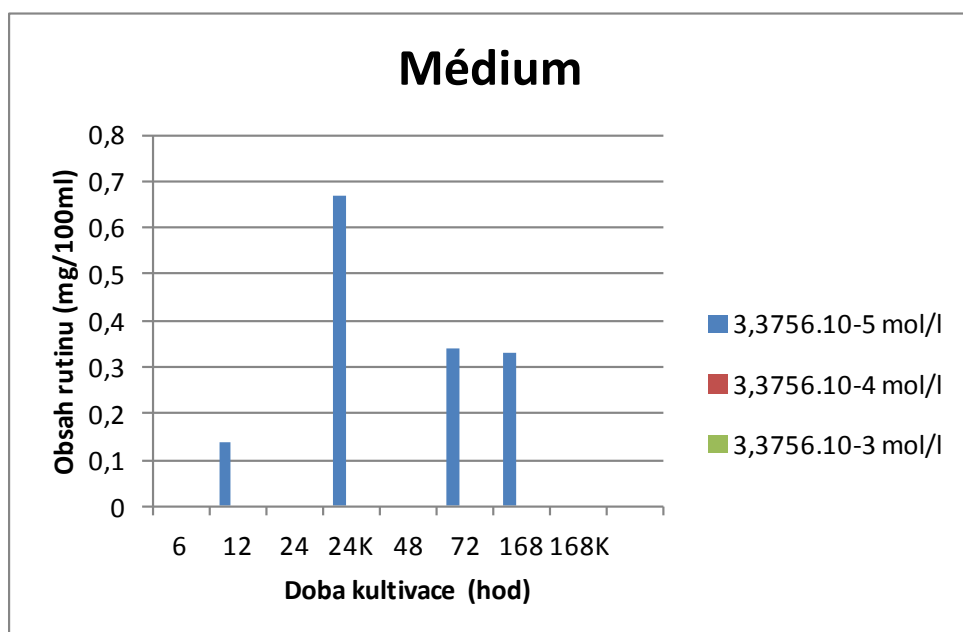
K – kontrola (bez elicitoru)

Graf č. 6: Produkce rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* L. elicitované MD 680/II o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l



K – kontrola (bez elicitoru)

Graf č. 7: Produkce rutinu (mg/100 ml) suspenzní kulturou *Fagopyrum esculentum* L. do živného média



K – kontrola (bez elicitoru)

7 Diskuze

V moderní terapii je využíváno kromě léků chemického původu také velké množství sekundárních metabolitů rostlin. V dnešní době však začíná být polní produkce rostlin (které obsahují tyto sekundární metabolity) nedostačující. Proto je snaha o hledání jiných metod získávání sekundárních metabolitů, popřípadě zvyšování jejich produkce.

Mezi jednu z takových metod se řadí i využití explantátových kultur rostlin. Tyto kultury, pěstované za přesně definovaných podmínek, lze určitou metodou elicitovat a tím docílit zvýšené produkce jejich sekundárních metabolitů.

Velké množství prací, mezi něž patří i tato, se proto zabývá výběrem takového elicitoru a takové doby elicitace, kterými by se docílilo zvýšené produkce těchto sekundárních látek v rostlinných kulturách *in vitro*.

V této rigorózní práci byla zvolena jako abiotický elicitor chemická sloučenina MD680/II, 3-{[3-(trifluoromethyl)benzyl]amino}pyrazine-2-carboxamide. Byl zjišťován vliv tohoto elicitoru na produkci rutinu v explantátové kultuře *Fagopyrum esculentum* L. ve třech různých koncentracích.

Ke kultivaci jak kalusové, tak i suspenzní kultury *Fagopyrum esculentum* L. bylo využito živné médium Murashigeho a Skooga s obsahem růstového regulátoru 2,4-D. Kalusová i suspenzní kultura byly kultivovány za normálního osvětlení 16 hod světlo a 8 hod tma a teploty 25°C.

Vzorky kalusové i suspenzní kultury byly postupně vystaveny působení MD680/II ve třech koncentracích, tj. $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Vzorky vystavené MD680/II byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hod elicitace.

Kontrolní vzorky, tj. vzorky, jež nebyly vystaveny vlivu MD680/II, byly odebírány ve 24 a 168 hod, hodnota kontroly obsahu rutinu v odběru ve 24 hod se vztahovala ke vzorkům, které byly odebrány v 6, 12, 24, 48 a

72 hod po elicitaci MD680/II. Kontrolní hodnota množství rutinu v odběru po 168 hod se vztahovala ke vzorku odebranému po 168 hod po elicitaci.

Stanovení obsahu rutinu v elicitovaných i kontrolních vzorcích bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Konečné hodnoty obsahu rutinu byly spočítány pomocí softwaru napojeného na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, software změřil jednotlivé obsahy píků a zpracoval je podle již naměřených píků u standardů. Při výpočtech byla vzata v úvahu navážka i ředění, výsledky jsou vztaženy na suchou hmotnost kultury *in vitro*.

Z výsledků je patrné, že kalusová kultura *Fagopyrum esculentum* L. vystavená elicitaci chemickou sloučeninou MD680/II začala produkovat větší množství rutinu.

Statisticky nejvýznamnější vzrůst produkce rutinu ($1,28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) byl pozorován po působení elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ a odběru po 168 hod, dále byla pozorována zvýšená produkce i po odběru po 24 hod ($0,68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) a 12 hod ($0,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$). (tab. č. 3) (graf č. 3)

Při použití elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ byly zaznamenány tři statisticky významnější nárůsty obsahu rutinu a to v odběru po 24 hod ($0,35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$), 48 hod ($0,48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) a po 72 hod ($0,49 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$). (tab. č. 2) (graf č. 2)

Při působení elicitoru o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ byly zaznamenány nárůsty produkce rutinu při odběru po 12 hod ($0,26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) a po 24 hod ($0,12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$). (tab. č. 1) (graf č. 1)

Při hodnocení vlivu elicitoru na produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* L. byly zjištěny nižší nárůsty obsahu rutinu.

Nejvyšší obsah rutinu ($0,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) byl pozorován při působení elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ a odběru po 168 hod. (tab. č. 5) (graf č. 5)

K nižšímu nárůstu obsahu rutinu došlo po aplikaci elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ a to v odběru po 48 hod a 72 hod ($0,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) a v odběru po 6 hod a 24 hod ($0,03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$). (tab. č. 6) (graf č. 6)

Nejnižší nárůst produkce rutinu (oboje $0,01 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$) byl zaznamenán po působení elicitoru v koncentraci $3,3756\cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ a odběru po 6 hod a 24 hod. (tab. č. 4) (graf č. 4)

Bylo zjišťováno též uvolňování rutinu do živného média. Rutin byl uvolňován do média pouze při působení elicitoru v koncentraci $3,3756\cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Nejvíce byl rutin uvolňován po 24 hod po elicitaci ($0,67 \text{ mg}/100\text{ml}$), dále po 48 hod po elicitaci ($0,34 \text{ mg}/100\text{ml}$), a také po 72 hod po elicitaci ($0,33 \text{ mg}/100\text{ml}$) a v odběru po 6 hod ($0,14 \text{ mg}/100\text{ml}$). (tab. č. 7) (graf č. 7)

Z výsledků této rigorózní práce je patrné, že chemická sloučenina MD680/II je vhodný elicitor pro zvýšení produkce rutinu v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* L. a méně vhodným elicitem pro zvýšení produkce rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* L.. Elicitací MD680/II bylo docíleno zvýšení produkce obsahové látky rutinu oproti kontrole (kultura nevystavená působení MD680/II).

K podobnému závěru, že deriváty pyrazinu jsou schopné zvyšovat produkci obsahových látek v kulturách *in vitro*, dospěli ve své studii Tůmová L., Tůma J. a Doležal M., kteří vystavovali kalusovou a suspenzní kulturu *Silybum marianum* L. působení 5-(2-hydroxybenzoyl)-pyrazin-2-karboxamidu a kalusovou a suspenzní kulturu *Ononis arvensis* L. působení N-(2-bromo-3-methylphenyl)-5-tert-butylpyrazin-2-karboxamidu. U suspenzní kultury *S. marianum* L. došlo ke zvýšení produkce obsahu silydianinu, a u kalusové kultury *S. marianum* L. došlo ke zvýšení obsahu silymarin komplexu. Při elicitaci *Ononis arvensis* L. došlo ke zvýšení produkce obsahu flavonoidů jak u kalusové, tak i suspenzní kultury. (38)

V další studii byly jako elicitory použity deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny, jež se ukázaly také jako účinné abiotické elicitory u kalusové kultury *Genista tinctoria* L.. Při této studii byly použity dvě sloučeniny, při jejichž použití došlo v obou případech ke zvýšení produkce isoflavonoidů v kultuře. (39)

Jako další sloučenina zvyšující produkci obsahových látek byl použit substituovaný N-phenylpyrazin-2-karboxamid. Bylo docíleno zvýšení produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. (40)

V jiné studii bylo prokázáno, že substituované pyrazinkarboxamidy výrazně ovlivnily produkci flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum* L.. V této studii byly použity dvě sloučeniny, N-(3-jod-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid (1) a N-(3-jod-4-methylfenyl)-5-terc-butyl-2-pyrazinkarboxamid (2). Při elicitaci sloučeninou (1) byl pozorován nárůst obsahu flavonolignanů a taxifolinu a při použití sloučeniny (2) jako elicitoru bylo pozorováno zvýšení obsahu silychristinu. (41)

I další dvě sloučeniny nasyntetizované na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv se prokázaly jako účinné abiotické elicitory. Bylo prokázáno, že nově syntetizované substituované amidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny jsou vhodnými elicitory na zvýšení produkce flavonolignanů u kalusové i suspenzní kultury *Silybum marianum* L. (42)

Dále bylo též zjištěno, že produkci sekundárních metabolitů zvyšují i deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny. Při použití elicitoru 2-(3-bromobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid byl zjištěn nárůst obsahu isoflavonoidů u kalusové i suspenzní kultury *Genista tinctoria*. (43)

V další studii byl jako abiotický elicitor použit 2-(2-fluoro-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid. Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. začala po elicitaci produkovat zvýšený obsah isoflavonoidů i flavonoidů. (44)

Elicitace chemickou sloučeninou MD680/II u kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* L. je vhodnou metodou pro zvýšení produkce rutinu.

8 Závěr

Cílem rigorózní práce bylo zjistit vliv MD680/II (jako abiotického elicitoru) na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum*. Na základě stanovení obsahu rutinu metodou HPLC zjistit, zda MD680/II je schopen ovlivnit produkci této obsahové látky

V elicítované kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* L. se podařilo významně zvýšit produkci flavonoidu rutinu. V suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* L. tak výrazný vzestup produkce nebyl pozorován.

Nejvyšší statisticky významná produkce rutinu byla zaznamenána u kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* L. po působení elicitoru o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l a odběru po 168 hod ($1,28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$), při koncentraci elicitoru $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l byl zaznamenán největší nárůst obsahu po 72 hod ($0,49 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$), při použití elicitoru o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l byla zaznamenána nejvyšší produkce při odběru po 12 hod ($0,26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$).

U suspenzní kultury byla nejvyšší produkce rutinu zaznamenána při použití elicitoru o koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l a odběru po 168 hod ($0,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$), po elicitaci koncentrací $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l byly zaznamenány dva nejvyšší nárůsty v odběru po 48 hod a 72 hod (oba $0,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$), nejnižší nárůst produkce rutinu byl u koncentrace $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l a odběru po 6 hod a 24 hod (oba $0,01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$).

Při sledování uvolňování rutinu do živného média bylo zjištěno, že rutin byl uvolňován do média pouze při použití elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Rutin byl nejvíce uvolňován v odběru po 24 hod elicitaci ($0,67 \text{ mg}/100\text{ml}$).

Z výsledků experimentu vyplývá, že chemická látka MD680/II je vhodným abiotickým elicitorem pro zvýšení produkce rutinu u kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* L..

9 Použitá literatura

- 1) Dostál J., Nová květena ČSSR, Praha, Academica, 1989, 236
- 2) <http://botanika.wendys.cz/kytky/K724.php>, 12. 5. 2013
- 3) <http://botany.cz/cs/fagopyrum-esculentum/>, 12. 5. 2013
- 4) Ministerstvo zdravotnictví ČR, Český lékopis, Praha, Grada Publishing a.s., 2009, 2069-2070
- 5) Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K., Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products, Food Chemistry, 2006, 98/3, 508-512
- 6) Tavcar E., Stojilkovski K., Kreft S., Fagopyrin and its derivatives in buckwheat (*Fagopyrum* sp.), Planta Medica, 2011, 77, 65
- 7) Wender S. H., Gortner R. A., Inman O. L., The isolation of photosensitizing agents from buckwheat, Journal of the american chemical society, 1943, 65/9, 1733-1735
- 8) www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0096303&tab=texts, 10. 5. 2014
- 9) <http://tee24.de/Kraeuter-A-C/Buchweizenkraut-geschnitten::356.html>, 22. 5. 2013
- 10) Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J. A., Briggs C. J., Rutin and flavonoid content in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effect against lipid peroxidation, Food Research International, 2007, 40/3, 356-364
- 11) <http://www.fytokomplexy.cz/clanky/Flavonoidy.html>, 22. 5. 2013
- 12) Hubík J., Dušek J., Řezáčová A., Štarhová A., Obecná farmakognosie II., Praha, SPN, 1986, 31-34
- 13) Minařík J., Farmakognosie, Praha, Avicenum, 1979, 140-141
- 14) Macholán L., Sekundární metabolity, Brno, Masarykova universita, 2003, 76-77
- 15) http://www.czechglobe.cz/files/skripta/Fyziologie_rostlin_skripta.pdf, 11.5.2014

- 16) Kováč J., Explantátové kultury rostlin, Ústí nad Labem, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Fakulta pedagogická, 1992, 1, 7-19, 23-24, 47-52, 59-62, 82-83
- 17) Sikyta B., Dušek J., Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 1992, 9, 50-55, 84-94
- 18) <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=187&sim=1100&cnt=1>, 10. 5. 2014
- 19) Sikyta B., Dušek J., Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 2001, 17-24, 75, 79-81
- 20) Kováč J., Explantátové kultury rostlin, Olomouc, Vydavatelství univerzity Palackého, 1995, 1-3, 17-18, 23-25, 33, 57-64, 79-82
- 21) Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., Fyziologie rostlin, Praha, Academia, 1998, 241-242, 424-425
- 22) Fiedlerová G., Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010, 33, 61
- 23) Jandourek O., Doležal M., Králová K., Pesko M., Microwave assisted synthesis of new pyrazinamide analogues and their biological evaluation. In Proceedings of the 16th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem., 1-30 November 2012, Sciforum Electronic Conferences, 2012
- 24) Doležal M., Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu, Chemické listy, 2006, 100, 959-966
- 25) Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P., Farmaceutická chemie IV., Praha, Karolinum, 2008, 119-120, 123-124
- 26) Murashige T., Skoog F., Physiologiae plantarum, 1962, 15, 473
- 27) Klimeš J., Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Hradec Králové, Nucleus HK, 2011, 245-246
- 28) Klimeš J., Kontrola léčiv I., Praha, Karolinum, 2008, 26, 33
- 29) Sergiel I., Pohl P., Biesaga M., Characterisation of honey according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Food chemistry, 2014, 145, 404-408
- 30) Irakli M. N., Samanidou V. F., Biliaderis C. G., Papadoyannis I. N., Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-

- HPLC with photodiode array detection, Journal of separation science, 2012, 35/13, 1603-1611
- 31) Vogrincic M., Kreft I., Filipic M., Zegura B., Antigenotoxic effect of tartary (*Fagopyrum tataricum*) and Common (*Fagopyrum esculentum*) buckwheat flour, Journal of medicinal food, 2013, 16/10, 944-952
- 32) Klimeš J., Sochor J., Mokřý M., Kastner P., Pilařová P., Kontrola léčiv II., Praha, Karolinum, 2007, 74, 79-80
- 33) Ďoubal S., Vybrané kapitoly z biofyziky, Praha, Karolinum, 2006, 6
- 34) <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/smerodatna-odchylka>, 16. 4. 2014
- 35) Ištók M., Bakalářská práce, Masarykova univerzita Brno, Fakulta sportovních studií, 2009, 21-22
- 36) <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/t-test>, 16. 4. 2014
- 37) Klemera P., Klemarová V., Základy aplikované farmacie, Praha, Karolinum, 1993, 25, 30, 31
- 38) Tůmová L., Tůma J., Doležal M., Pyrazinecarboxamides as potential elicitors of flavonolignan and flavonoid production in *Silybum marianum* and *Ononis arvensis* cultures in vitro, Molecules, 2011, 16/11, 9142-9152
- 39) Tůmová L., Tůma J., Doležal M., Danielová B., Pyrazinecarboxylic acid derivatives as effective abiotic elicitors of isoflavonoids production, Česká a Slovenská Farmacie, 2010, 59/3, 117-122
- 40) Doležal M., Tůmová L., Kesetovicova D., Tůma J., Kral'ová K., Substituted N-phenylpyrazine-2carboxamides, their synthesis and evaluation as herbicides and abiotic elicitors, Molecules, 2007, 12/12, 2589-2598
- 41) Tůmová L., Tůma J., Megusar K., Doležal M., Substituted pyrazinecarboxamides as abiotic elicitors of flavonolignan production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cultures in vitro, Molecules, 2010, 15/1, 331-340
- 42) Tůmová L., Gallová K., Řimáková J., Doležal M., Tůma J., The effect of substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids on flavonolignan production in *Silybum marianum* culture in vitro, Acta physiologiae plantarum, 2005, 27/3B, 357-362

- 43) Tůmová L., Klimešová V., Vildová A., The effect of pyridinecarbothioamides on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* cultures *in vitro*, Natural product communications, 2013, 8/5, 593-596
- 44) Kašparová M., Siatka T., Klimešová V., Dušek J., New synthetic pyridine derivate as potential elicitor in production of isoflavonoids and flavonoids in *Trifolium pratense* L. suspension culture, Scientific world journal, 2012, 746412

10 ABSTRAKT

Ovlivnění produkce sekundárních látek v rostlinných kulturách *in vitro*

Byl sledován vliv chemické sloučeniny MD680/II (3-[[3-(trifluoromethyl)benzyl]amino}pyrazine-2-carboxamide) o koncentracích $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l jako abiotického elicitoru na produkci obsahové látky rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* L.

Kalusová i suspenzní kultura byla kultivována v živném médiu Murashigeho a Skooga s obsahem růstového regulátoru (2, 4 – D) za teploty 25 °C a světelného režimu 16 hod světlo a 8 hod tma. Elicitované vzorky byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hod po expozici elicitem, kontrolní vzorky byly odebírány po 24 a 168 hod. Stanovení obsahu rutinu bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Nejvyšší nárůst obsahu rutinu ($1,28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) u kalusové kultury byl pozorován po aplikaci elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l a odběru po 168 hod, při použití elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l a odběru po 72 hod ($0,49 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) a v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l a odběru po 12 hod ($0,26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$).

U suspenzní kultury byla nejvyšší produkce rutinu ($0,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) zaznamenána při použití elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l a odběru po 168 hod, po aplikaci elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l a odběru po 48 hod a 72 hod ($0,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) a u koncentrace $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l a odběru po 6 hod a 24 hod ($0,01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$).

Bylo též pozorováno uvolňování rutinu suspenzní kulturou do živného média. Rutin ($0,67 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) byl uvolňován pouze při aplikaci elicitoru v koncentraci $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l a nejvíce v odběru po 24 hod.

ABSTRACT

Influencing of secondary compounds production in plant cultures *in vitro*

The effect of chemical compound MD680/II as abiotic elicitor (3-{{3-(trifluoromethyl)benzyl}amino}pyrazine-2-carboxamide), in concentration of $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l and $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l on the routine production in *Fagopyrum esculentum* L. callus and suspension culture was investigated.

Callus and suspension culture was cultivated in Murashige and Skoog nutrient medium supplemented with (2, 4 – D) as the growth regulator with luminous period 16 h light and 8 h darkness at 25 °C. The samples were taken in 6, 12, 24, 48, 72 and 168 h after elicitor exposition. The control samples were taken in 24 and 168 h. The amount of routine was defined by High performance liquid chromatography.

The highest increase of routine content in callus culture was most apparent after elicitor application of $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l and 168 h sampling (1,28 mg.g⁻¹DW), in concentration of $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l and 72 h sampling (0,49 mg.g⁻¹DW) and in concentration of $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l and 12 h sampling (0,26 mg.g⁻¹DW).

The highest increase of routine content in suspension culture was apparent after elicitor treatment in concentration of $3,3756 \cdot 10^{-4}$ mol/l and 168 h sampling (0,32 mg.g⁻¹DW), in concentration of $3,3756 \cdot 10^{-3}$ mol/l and 48 h and 72 h sampling (both 0,04 mg.g⁻¹DW) and in concentration of $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l and 6 h and 24 h sampling (both 0,01 mg.g⁻¹DW).

Routine release into the nutrient medium was also detected. The routine release was apparent only after elicitor application in concentration of $3,3756 \cdot 10^{-5}$ mol/l and after 24 h sampling (0,67 mg/100ml).