

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOSIE

Hypericum perforatum in vitro- abiotická elicitace

Mgr. Jitka Majerová

(rigorózní práce)

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| Vedoucí katedry: | Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc. |
| Vedoucí rigorózní práce: | Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc. |
| Počet stran: | 61 |
| Oponent: | PharmDr. Jan Martin, PhD. |

V Hradci Králové, 2015

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a poskytnuté rady při zpracování rigorózní práce. Dále bych chtěla vyjádřit poděkování PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za pomoc při analytickém zpracování výsledků pomocí HPLC a v neposlední řadě také pracovníkům katedry farmakognosie za přátelskou atmosféru při realizaci praktické části.

Prohlašuji, že práci jsem vypracovala samostatně a je tedy mým původním autorským dílem. Veškerou literaturu, kterou jsem při psaní práce použila, jsem uvedla v seznamu literatury. V práci jsem tuto literaturu řádně citovala.

V Hradci Králové dne

.....

Mgr. Jitka Majerová

OBSAH

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | ÚVOD | 6 |
| 2 | CÍL | 7 |
| 3 | TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 3.1 | Hypericum perforatum | 8 |
| 3.1.1 | Charakteristika a taxonomie..... | 8 |
| 3.1.2 | Droga..... | 8 |
| 3.1.3 | Obsahové látky..... | 9 |
| 3.1.3.1 | Naftodianthrony..... | 9 |
| 3.1.3.2 | Fluoroglucinoly | 10 |
| 3.1.3.3 | Flavonoidy..... | 12 |
| 3.1.4 | Účinky třezalky | 13 |
| 3.1.4.1 | Antidepresivní efekt | 13 |
| 3.1.4.2 | Antibakteriální a antivirový efekt..... | 15 |
| 3.1.4.3 | Protirakovinný efekt | 15 |
| 3.1.4.4 | Protizánětlivý efekt..... | 16 |
| 3.1.4.5 | Antioxidační a neuroprotektivní efekt..... | 16 |
| 3.1.4.6 | Antinociceptivní efekt | 17 |
| 3.1.5 | Nežádoucí účinky..... | 17 |
| 3.1.5.1 | Fototoxicita..... | 17 |
| 3.1.6 | Lékové interakce | 18 |
| 3.2 | Explantátové kultury | 20 |
| 3.2.1 | Druhy explantátových kultur | 20 |
| 3.2.2 | Výhody a nevýhody kultur <i>in vitro</i> | 20 |
| 3.2.3 | Živné médium a jeho složení | 21 |
| 3.3 | Produkce sekundárních metabolitů <i>in vitro</i> | 21 |
| 3.3.1 | Elicitace..... | 22 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.2 | Prekurzory | 23 |
| 3.4 | Hypericum perforatum a elicítace | 23 |
| 3.5 | Cer a ostatní lanthanoidy | 24 |
| 3.5.1 | Charakteristika | 24 |
| 3.5.2 | Bezpečnost ceru | 24 |
| 3.5.3 | Využití ceru | 25 |
| 3.5.4 | Lanthanoidy a elicítace | 25 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 27 |
| 4.1 | Přístroje a vybavení | 27 |
| 4.2 | Chemikálie | 27 |
| 4.3 | Rostlinný materiál | 28 |
| 4.4 | Složení a příprava živného média | 28 |
| 4.5 | Průběh kultivace | 29 |
| 4.6 | Příprava elicitoru | 30 |
| 4.7 | Vlastní elicítace | 31 |
| 4.8 | Stanovení obsahu hyperosidu | 31 |
| 4.8.1 | Postup stanovení | 31 |
| 4.8.2 | Vlastní HPLC analýza | 32 |
| 4.9 | Statistické zpracování dat | 34 |
| 5 | VÝSLEDKY | 36 |
| 5.1 | Tabulky | 36 |
| 5.2 | Grafy | 42 |
| 6 | DISKUZE | 46 |
| 7 | ZÁVĚR | 50 |
| 8 | ZDROJE | 51 |
| 9 | ABSTRAKT | 60 |
| 10 | ABSTRACT | 61 |

1 ÚVOD

I přes neustále se rozvíjející potenciál syntetických léčiv roste zájem o fytofarmaka, která si neustále drží své místo v léčbě určitých onemocnění (1). Oblíbenost třezalky dokazuje i množství lidí, kteří užívali třezalkové přípravky nejen v Americe, ale i v Evropě. V roce 1995 se v Americe utržilo za třezalkové přípravky 20 miliónů dolarů. O pouhé 2 roky déle byla tato cena odhadována na 400 miliónů dolarů. (2). I u nás je registrovaných několik přípravků obsahujících *Hypericum perforatum*. Některá z nich jsou volně prodejná (HYPERICUM PERFORATUM AKH, TRAUMEEL) a některá jsou vázána na lékařský předpis (HYPERICUM PERFORATUM v různém ředění, LAIF 900 mg, JARSIN 300 mg) (3).

Deprese patří k nejčastějším psychologickým problémům. Odhaduje se také, že depresí trpí 9-26 % žen a 5-12 % mužů (4). Běžně se léčí syntetickými antidepresivy, ale je také známo, že lehčí depresivní stavy lze léčit přírodními produkty (5).

Rostliny obsahují velké množství účinných látek, jejichž syntéza může být finančně náročná nebo technologicky špatně zvládnutelná. Farmaceutické společnosti se snaží získávat přírodní obsahové látky různými alternativními cestami. Mezi nejvýznamnější patří biotechnologické metody (1).

Jednou ze zmiňovaných biotechnologických metod je i metoda elicítace, kterou jsem se zabývala ve své práci. Abiotické elicítaci pomocí ceřitých iontů jsem podrobila suspenzní a kalusovou kulturu *Hypericum perforatum*. Dále jsem zkoumala uvolňování hyperosidu do živného média.

2 CÍL

Cílem práce bylo zjistit vliv abiotického elicitoru na produkci hyperosidu v suspenzní a kalusové kultuře *Hypericum perforatum*. Dále byl zkoumán vliv elicitoru na uvolňování hyperosidu do živného média. Ve všech vzorcích byl následně zjišťován obsah hyperosidu pomocí HPLC metody.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Hypericum perforatum*

3.1.1 Charakteristika a taxonomie

Jedná se o vytrvalou bylinu z čeledi *Hypericaceae* (třezalkovité). K rodu *Hypericum* náleží přibližně 400 druhů rostlin a keřů se žlutými nebo měděnými květy, 4-5 korunními lístky a velkým množstvím tyčinek okolo jednoho pestíku (6).

Rostlina je původní v Evropě, ale postupně se rozšířila do mírného podnebí Asie, Afriky, Austrálie, Severní a Jižní Ameriky (6). Dorůstá výšky cca 60 cm (5).

Je charakteristická přímou, oblou, tečkovanou lodyhou, která je pokrytá vstřícnými, celokrajnými tečkovanými listy (7). Listy obsahují žlázy s rostlinným olejem. Kvetे v červnu až červenci (5) bohatými žlutými květy, které jsou uspořádané do lat (7). Květy ukrývají mnoho tyčinek (7) Korunní lístky obsahují červené barvivo ukryté v černých žlázkách (7). Plodem je tobolka obsahující 12 malých, tmavě hnědých semen (6).

Třezalka je také známa pod lidovým názvem bylina sv. Jana, který je odvozený od doby jejího kvetení (24. června). Stejněho původu jsou i zahraniční názvy St. John's wort/ Johanisskraut. Bible vysvětluje, že černo-červené tečky na květech symbolizují krev sv. Jana. Průhledné tečky na listech charakterizují slzy nad jeho osudem (8).

Třezalka se jako léčivá bylina využívá již od antického Řecka, kde ji poprvé doporučoval Galen a Hippokrates (10,11,12). Již v roce 1525 Paracelsus doporučil třezalku pro léčbu deprese, přecitlivělosti a melancholie (13).

3.1.2 Droga

Drogu tvoří kvetoucí nať (*Hyperici herba*) získaná z matečné rostliny *Hypericum perforatum* L. Obsahuje minimálně 0,08 % celkových hypericinů (vyjádřeno jako hypericin) a počítáno na usušenou drogu (9).

3.1.3 Obsahové látky

Doposud bylo identifikováno několik skupin biologicky aktivních látek (14). Mezi nejvýznamnější patří následující sloučeniny: (15,16)

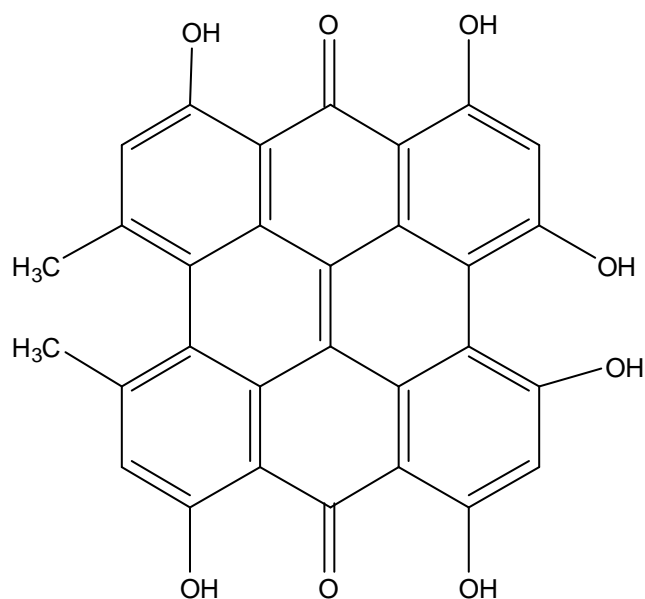
- naftodianthrony (hypericin a pseudohypericin)
- fluoroglucinoly (hyperforin a adhyperforin)
- flavonoidy (rutin, kvercetin, kvercitrin, hyperosid)
- třísloviny
- biflavanony (biapigenin a amentoflavon) (17)
- proanthocyanidiny- katechin, epikatechin a procyanidin (17)
- aminokyseliny (17)
- organické kyseliny- kyselina kávová (17)

3.1.3.1 Naftodianthrony

Patří sem hlavně hypericin, pseudohypericin (17).

Hypericin způsobuje červené zbarvení třezalkového oleje, který se nachází hlavně v květech a částečně i v černých žlázkách na okvětních lístcích (18).

Strukturně se jedná o polycyklický chinon, který obsahuje hydroxylové skupiny v těsném sousedství karbonylových násobných vazeb. Díky resonanci a krátké vzdálenosti kyslíkových atomů (hydroxylové a karbonylové skupiny) se třezalka vyznačuje fotoreaktivitou. Vodíkový atom (z hydroxylové skupiny) je schopný přenosu mezi kyslíkem hydroxylové skupiny a kyslíkem karbonylové skupiny za současné fluorescence. Různými studiemi byla prokázána existence „protonizované“ karbonylové skupiny a fluorescenční spektrum hypericinu (19).



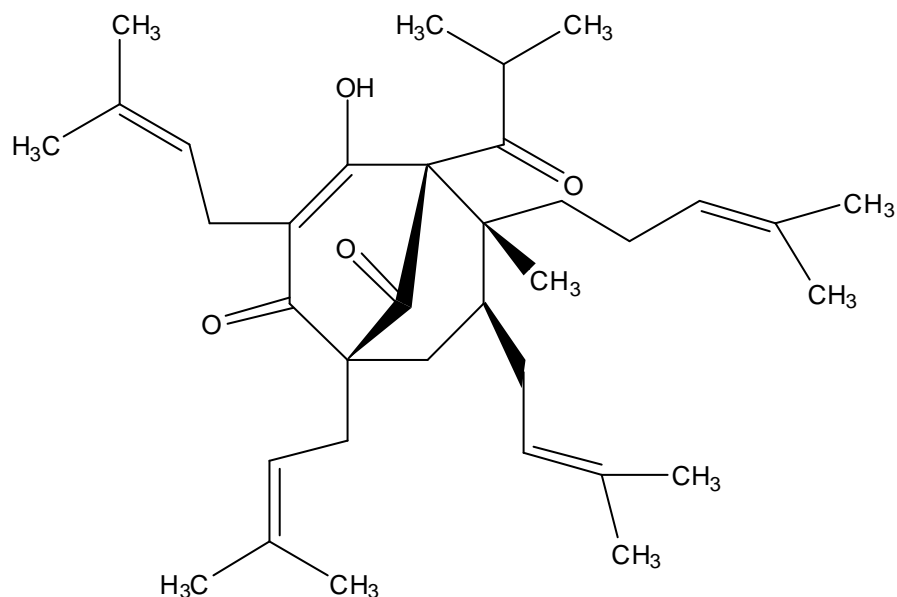
Obrázek 1: Hypericin (86)

Hypericin vystupuje jako inhibitor různých enzymů (monoaminoxidáza, proteinkináza C) a systémů zpětného vychytávání neurotransmiterů (serotonin, noradrenalin) (16,17).

3.1.3.2 Fluoroglucinoly

Jsou zastoupeny hyperforinem a adhyperforinem (16,17).

Hyperforin je složitá bicyklická sloučenina substituovaná izoprenovými řetězci (21). Díky své struktuře je velmi citlivý na vnější podmínky- světlo, kyslík (21). Tímto se vysvětluje problematika totální syntézy hyperforinu (20).



Obrázek 2: Hyperforin (87)

Hyperforin vystupuje jako inhibitor zpětného vstřebávání serotoninu, noradrenalinu, dopaminu, způsobuje tzv. down- regulaci kortikálních serotoninových (5-HT₂) receptorů a beta-adrenergických receptorů. V posledních letech byla popsána jeho inhibice zpětného vychytávání GABA (gamaaminomáselná kyselina) a L-glutamátu. Byl popsán i jeho vliv na zvýšení intracelulární koncentrace sodíku (16,17).

Jeho mechanismus inhibice zpětného vstřebávání serotoninu se vysvětluje skrz ovlivnění intracelulární koncentrace sodíku a vápníku (22,23,24). Treiber potvrdil, že influx sodných kationtů je zprostředkován pomocí neselektivních kationových kanálů (NSCCs), na které působí i hyperforin (25). Mezi další působení hyperforinu řadíme i jeho potenciál zvyšovat množství serotoninových receptorů, což bylo potvrzeno studiiemi na myších (26).

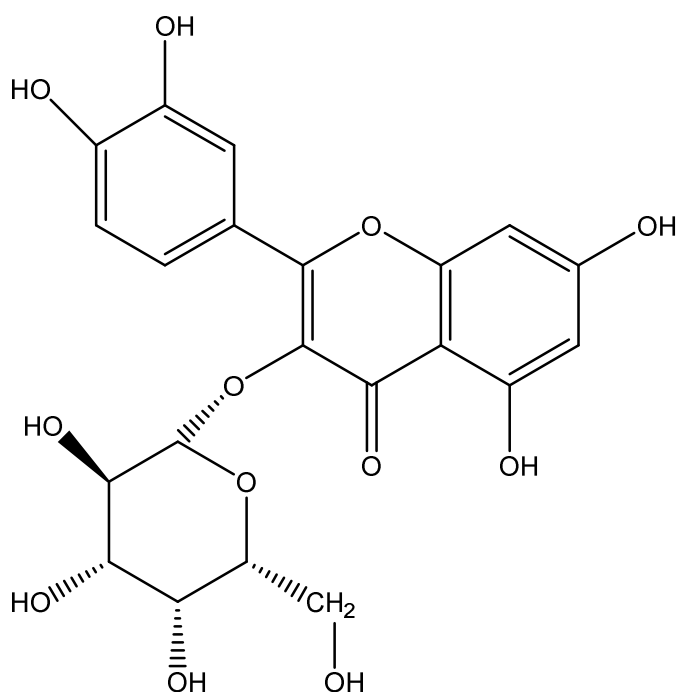
Klinické studie prokázaly, že terapeutická úroveň třezalky je přímo závislá na množství hyperforinu (27).

3.1.3.3 Flavonoidy

Mezi nejvýznamnější flavonoidy patří hyperosid, rutin, kvercetin (15,16).

Chemicky je hyperosid glykosid. Jeho cukernou složku představuje galaktóza, aglykonem je kvercetin (kvercetin-3-O-galaktosid) (28).

Již v minulosti bylo provedeno několik různých studií zabývajících se účinky hyperosidu na různé zdravotní problémy. V roce 2011 byl hyperosid zkoušen v souvislosti s Alzheimerovou chorobou. Ta je charakterizována tvorbou β -amyloidu a následným poškozením neuronů. Zjistilo se, že hyperosid snižuje β -amyloidem iniciované poškození mitochondrií (29).



Obrázek 3: Hyperosid (88)

Hyperosidu je přisuzován antivirový, antioxidační, antiapoptotický a protizánětlivý efekt, který byl zkoumán v posledních letech. Zjistilo se, že hyperosid snižuje tvorbu prozánětlivých mediátorů tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α), interleukinu 6 (IL-6) a oxidu dusnatého (NO). Nejlepší suprese těchto působků byla sledována při 5 μ M koncentraci hyperosidu (30).

V různých studiích byla zkoušena kombinace flavonoidů (kvercetin a hyperosid). Koncem roku 2014 byla publikovaná studie zabývající se ukládáním oxalátových močových solí v ledvinách. Účinek kombinace kvercetinu a hyperosidu (20 mg/kg/den) byla porovnávána s placebem a se standardním lékem (citronan draselný). Bylo zjištěno, že flavonoidní kombinace signifikantně snižovala množství ukládaných oxalátových solí (31).

Dále byl sledován vliv kombinace hyperosidu a kvercetinu (1:1) na buňky ledvinných nádorů (32), nádorů prostaty (33). Kombinace resveratrolu a kvercetinu (1:1) měla pozitivní účinek při léčbě leukémie (34).

3.1.4 Účinky třezalky

Třezalka byla využívána i v minulosti hlavně pro svůj antidepresivní a zklidňující efekt. Nejčastěji se dnes využívá k léčbě mírných forem deprese. Třezalka se dá použít i pro svůj protizánětlivý, protirakovinný, antioxidační a neuroprotektivní, antibakteriální a antivirový efekt (18).

Nejvíce využívanou rostlinou rodu *Hypericum* je třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*), ale nepatří mnohdy k těm nejvíce účinným.

Některé druhy tohoto rodu jsou srovnatelně účinné (*Hypericum richeri*). Druhy, které obsahují více nafrodianthronů se vyznačují vyšší antivirovou a antiretrovirovou aktivitou (*Hypericum androseamum*, *H. annulatum*, *H. barbatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. humifusum*, *H. montanum*, *H. montbretii*, *H. richeri*, *H. rumeliacum*, *H. thasium*, and *H. patulum*) (35).

3.1.4.1 Antidepresivní efekt

Nejdůležitější je její potenciál při léčbě depresí, proto byly v minulosti prováděny různé studie zabývající se jejím antidepresivním efektem (18).

Hlavní složkou zodpovědnou za antidepresivní efekt je hyperforin (35).

Asi nejznámější je metaanalýza, kterou provedl Linde v roce 1996. Porovnával míru účinku extraktu z třezalky na mírné depresivní stavy s placebem a se standardními antidepresivy. Informace získával z 23 klinických studií, kterých se celkem zúčastnilo 1757 ambulantních pacientů. Zjistil, že extrakt z třezalky je signifikantně účinnější než placebo. Dále je stejně účinný jako standardní antidepresiva, ale má nižší výskyt nežádoucích účinků než běžně používaná antidepresiva (36).

Dále byla třezalka zkoumána i v terapii těžších forem deprese. V roce 2002 proběhla multicentrická studie probíhající v USA. Výsledkem bylo zjištění, že plnou nebo alespoň částečnou odpověď na standardizovaný třezalkový extrakt reagovalo 47,5 % pacientů, což je méně než ve skupině placebo a standardního antidepresiva (sertralin). Sami autoři přiznávají, že jejich výsledky se výrazně neliší ani v jedné skupině. Přikládají to nízké citlivosti celé studie (37).

V současné době se třezalka nejvíce využívá jako přírodní antidepresivum. V České republice je dostupný léčivý přípravek Jarsin obsahující 300 mg standardizovaného třezalkového extraktu. Tento přípravek je pouze na lékařský předpis. Nicméně stále více využívaná je třezalka ve formě čajů nebo potravních doplňků. Spotřebu léčivého přípravku Jarsin za rok 2010 na úrovni distributorů vystihuje tabulka 1. Jen v tomto roce se distribuovalo 8983 balení celkem za 1 827 643 Kč.

Tabulka 1: Spotřeba léčivého přípravku Jarsin v roce 2010 na úrovni distributorů (90).

| Název přípravku | Doplněk názvu | Počet balení | Celkem finance s max. obch. přírůžkou a DPH | Celkem finance bez obch. přírůžky a DPH |
|-----------------|-----------------------|--------------|---|---|
| JARSIN 300 | POR TBL OBD 100X300MG | 1873 | 381043,12 | 254709,27 |
| JARSIN 300 | POR TBL OBD 100X300MG | 2174 | 442322,04 | 295664 |
| JARSIN 300 | POR TBL OBD 100X300MG | 1800 | 366228 | 244800 |
| JARSIN 300 | POR TBL OBD 100X300MG | 3136 | 638050,56 | 426496,00 |
| | | 8983 | 1827643,72 | 1221669,27 |

3.1.4.2 Antibakteriální a antivirový efekt

Již od nepaměti se třezalka používala na různé řezné rýny, odřenin (18). V roce 1959 se podařilo identifikovat obsahovou látku, která je za tento antibakteriální efekt zodpovědná. Je jím hyperforin, který inhibuje růst všech gram- pozitivních bakterií, ale nepůsobí na gram- negativní (38).

Nejdůležitější látkou zodpovědnou za antivirový efekt je hypericin. Zjistilo se, že působí pouze na viry obalené (39) a to zásahem do různých částí jejich životního cyklu (40). U pseudohypericinu a hypericinu byla dokonce objevena antiretrovirová aktivita (35).

3.1.4.3 Protirakovinný efekt

V tomto ohledu byl studován hlavně **hyperforin**, který inhibuje růst nádorových buněk *in vitro* cestou apoptózy (přes aktivaci kaspáz). Díky hyperforinu dochází k tvorbě pro-apoptotických působků. Jako antitumorová látka by se dal hyperforin charakterizovat následujícím způsobem: (41)

- působí na různé lidské tumorové buňky
- je snadno dosažitelný ve větším množství
- jeho nízká toxicita *in vivo*

Ani **hypericin** nešel pozorování v antitumorové oblasti. Díky jeho fotoreaktivnímu potenciálu se studoval právě v souvislosti se světelným osvitem. Zjistilo se, že hypericin vystupuje v roli významného fotosenzitizéru, který se koncentruje v nádorových buňkách. Po světelném osvitu těchto buněk uvolňuje hypericin cytotoxické produkty (superoxidové radikály), které vedou k ireverzibilnímu poškození nádorových buněk (42). Díky svému fytotoxickému efektu (indukce apoptózy), poskytuje hypericin možnost rozvoje moderních metod léčení nádorů (tzv. fotodynamická terapie).

Využití hypericinu u nasofaryngeálních nádorů dokumentoval Höpfner v roce 2003. Díky svému silnému fytotoxickému potenciálu má světlem aktivovaný hypericin stejné účinky jako delta-aminolevulová kyselina (5-ALA), která se běžně ve fototerapii

používá. Nicméně uvedená kyselina má vyšší míru nežádoucích účinků než hypericin, který je v neaktivované formě bez vedlejších účinků (43).

Roscetti ukazuje synergistický vztah mezi jednotlivými součástmi třezalkového extraktu. Zjistil, že samotný hypericin je pouze velmi slabým inhibitorem růstu nádorových buněk (buněčná linie K562) oproti metanolovému extraktu. Míra inhibičního účinku je podle něj závislá na koncentraci extraktu (44).

3.1.4.4 Protizánětlivý efekt

Protizánětlivý efekt je docílen hlavně cestou inhibice tvorby prozánětlivých působků- prostaglandin E2 (PGE2), interleukin 1 β (IL-1 β), tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) (45). Mezi nejvýznamnější účinné složky patří:

1. Složky lipofilního charakteru. Jedná se o kvercetin a biapigenin. Ukázalo se, že tyto složky mají vedle protizánětlivého efektu i výrazný gastroprotektivní vliv (46).
2. Amentoflavon, kvercetin, pseudohypericin a hyperforin. Pokusy prokázaly, že samostatné složky mají sice protizánětlivý efekt, ale až v množstvích, která převyšují koncentrace v extraktu. Pouze pseudohypericin a hyperforin vykazují protizánětlivou aktivitu i při koncentracích blízkých těm v extraktu (47).

3.1.4.5 Antioxidační a neuroprotektivní efekt

Antioxidační a neuroprotektivní působení je významné hlavně u neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova a Parkinsonova choroba). Výrazným neuroprotektivním efektem se vyznačuje hyperforin. Je mu připisována schopnost rozložit agregované β -amyloidové plaky (48). Zde se preventivně uplatňují svým antioxidačním působením právě flavonoidy (29).

Flavonoidy jsou také zodpovědné za snížení peroxidace membránových lipidů mitochondrií (kvercetin, kempferol). Dále je biapigeninu přisuzována schopnost udržovat membránový potenciál mitochondrií poklesem jejich kumulace vápníku (49).

Třezalkový extrakt snižoval oxidační vliv peroxidu vodíku. Buňky ošetřené třezalkovým extraktem před působením peroxidu vykazovaly daleko vyšší životaschopnost než ty bez vlivu extraktu (50).

Nedávné studie publikované v roce 2014 ukazují, že se třezalka dá s pozitivními výsledky využít i u diabetických pacientů, kteří jsou ohroženi špatnou kontrolou glykémie. Právě vysoká hladina glykémie rozvíjí vaskulární zánět s mnoha dalšími následnými procesy (zvýšená vaskulární propustnost, exprese adhezivních molekul, tvorba reaktivních forem kyslíku). Vše zmiňované se spojuje s rozvojem aterosklerózy, která je komplikací diabetu (51).

3.1.4.6 Antinociceptivní efekt

Studie publikovaná v roce 2010 ukazuje, že třezalka může být prospěšná při bolestivých stavech. Účinnými látkami jsou hypericin a hyperforin. Hypericin selektivně blokuje proteinkinázu C a hyperforin zvyšuje produkci antinociceptivních opioidů (52).

3.1.5 Nežádoucí účinky

Množství a závažnost nežádoucích účinků třezalky se výrazně liší od běžně užívaných antidepresiv, která jsou spojena s množstvím vedlejších účinků, pro které někdy pacienti od léčby ustupují.

Samostatně je třezalka velmi dobře snášena, pouze někteří citliví pacienti mohou mít gastrointestinální problémy (nauzea, vomitus), únavu, sucho v ústech a alergie (17).

3.1.5.1 Fototoxicita

Podstatou fytotoxické reakce je přítomnost fotosensibilizátoru v kůži, který po osvětlení slunečním zářením absorbuje část jeho energie. Energie tím v tkáni vyvolá fotodynamický efekt (53).

Nejdůležitější je ultrafialové a viditelné světlo v rozmezí vlnových délek 320-400 nm (UVA) a 280-320 nm (UVB). Nejvíce se uplatňuje UVA světlo. Zde platí

nepřímá úměra mezi vlnovou délkou a hloubkou průniku do kůže. Podobně je závislá i vlnová délka a energie. Na kůži se nejčastěji projevuje zarudnutím (většinou ohraničené), pálením, vznikem puchýřů (53).

Za fytotoxickou reakci třezalky je zodpovědný hypericin (54).

3.1.6 Lékové interakce

Třezalka tečkovaná je v posledních letech široce využívaným přírodním antidepresivem. Její použití není úplně bez rizik. Je spojována s častými lékovými interakcemi.

Nejvíce interakci se vyznačují následující léky: (55)

- inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)
- cyklosporin
- digoxin
- warfarin
- orální kontraceptiva
- inhibitory monoaminooxidázy (IMAO)
- theofylin

Vystupuje jako silný **induktor různých forem cytochromu P450**. Důsledkem toho dochází k rychlejšímu metabolismu léků a poklesu jejich terapeutických hladin na již neúčinné (56). Mezi nejvýznamněji ovlivněné izoenzymy patří: CYP 3A4 (55), CYP 2C9 (57). Na druhou stranu se zjistilo, že složky extraktu neovlivňují izoformy CYP 1A2 ani CYP 2D6 (57).

Za indukci enzymů je zodpovědný hyperforin. Hypericin neovlivňuje žádné izoformy (57).

Cyklosporin je významným imunosupresivním lékem. Při současném užívání třezalky klesají jeho terapeutické hladiny, což může mít za následek rejekci transplantovaného štěpu (56). Studie *in vivo* na psech, provedená v roce 2012, ukazuje, že současné podávání těchto dvou látek prokazatelně snižuje koncentrace imunosupresiva v krvi (58).

Kontraceptiva představují další skupinu látek, kde se významně posílí interakce, která vede ke snížení účinnosti kontraceptiv a metrorrhagii (59).

V posledních letech byla zkoumána farmakokinetika docetaxelu v kombinaci s třezalkovým extraktem. Studie publikovaná v roce 2014 uvádí, že prostřednictvím indukce CYP3A4 dochází k poklesu účinku docetaxelu. Na druhou stranu i klesají jeho nežádoucí účinky (60).

Z hlediska interakcí je významný také **indukční potenciál na úrovni P-glykoproteinu**. Mezi hojně zkoumaná léčiva v této oblasti patří digoxin. V roce 1999 se zjistilo, že jednorázové podání třezalky nevede ke změně hladin digoxinu, ale po 10 dnech k redukci terapeutických hladin docházelo (61).

Indukce P-glykoproteinu nemusí být vždy negativně vnímána. V roce 2014 byla publikovaná studie, která využívá indukčního vlivu třezalky na P-glykoprotein. Zjistilo se, že právě tento glykoprotein má vliv na odstraňování toxického beta-amyloidu z mozkové tkáně. Usuzuje se, že by se v budoucnu dala využívat ke zpomalení progresu Alzheimerovy choroby (62).

3.2 Explantátové kultury

Explantátové kultury jsou založené na kultivaci různých rostlinných částí v předem definovaných podmínkách *in vitro*. Existence kultur je založena na totipotenci rostlinných buněk, díky které nezáleží na tom, z jaké rostlinné části se kultura odvodí. (63).

3.2.1 Druhy explantátových kultur

Rozeznáváme několik druhů kultur *in vitro*: (63)

- kalusová
- suspenzní
- embryokultura
- meristémová
- protoplastová

3.2.2 Výhody a nevýhody kultur *in vitro*

Tabulka 2: Nejdůležitější rozdíly v kulturách *in vitro* a polní produkci (63,64).

| Výhody kultur <i>in vitro</i> | nevýhody kultur <i>in vitro</i> |
|---|---|
| Redukce nákladů na skleníky- na malém prostoru můžeme kultivovat hodně kultur | Laboratorní nákladnost- laminární box, vysterilizované pomůcky i médium... |
| Totipotence umožňuje založení kultury z jakékoliv části rostliny | Elektrická energie (třepačky) |
| Minimalizace rizika mikrobiálních nákaz díky aseptickým podmínkám | Neustálé dodržování definovaných podmínek (20 °C, 16 hodin světlo, 8 hodin tma) |
| Snížení kontaminace rostlin (herbicity...) | Nemožnost automatizace |
| Bez vlivu klimatických podmínek | Proškolení pracovníků |

3.2.3 Živné médium a jeho složení

Složení živného média hraje důležitou roli v množství a charakteru produkovaných látek. Obecně lze složení média vyjádřit následovně: (63)

- *makroelementy*- dusík, fosfor, hořčík, vápník, draslík a síra
- *mikroelementy*- mangan, železo, molybden, měď, zinek, bór,
- *zdroje organického dusíku*- L-glutamin, hydrolyzát kaseinu
- *vitamíny*- katalyzátory biochemických reakcí
- *regulátory růstu (fytohormony)*- auxiny, gibereliny a kyselina abscisová, cytokiny
- *zdroj uhlíku*- sacharóza
- *složky zpevňující živné médium*- agar
- *nedefinované složky*

3.3 Produkce sekundárních metabolitů in vitro

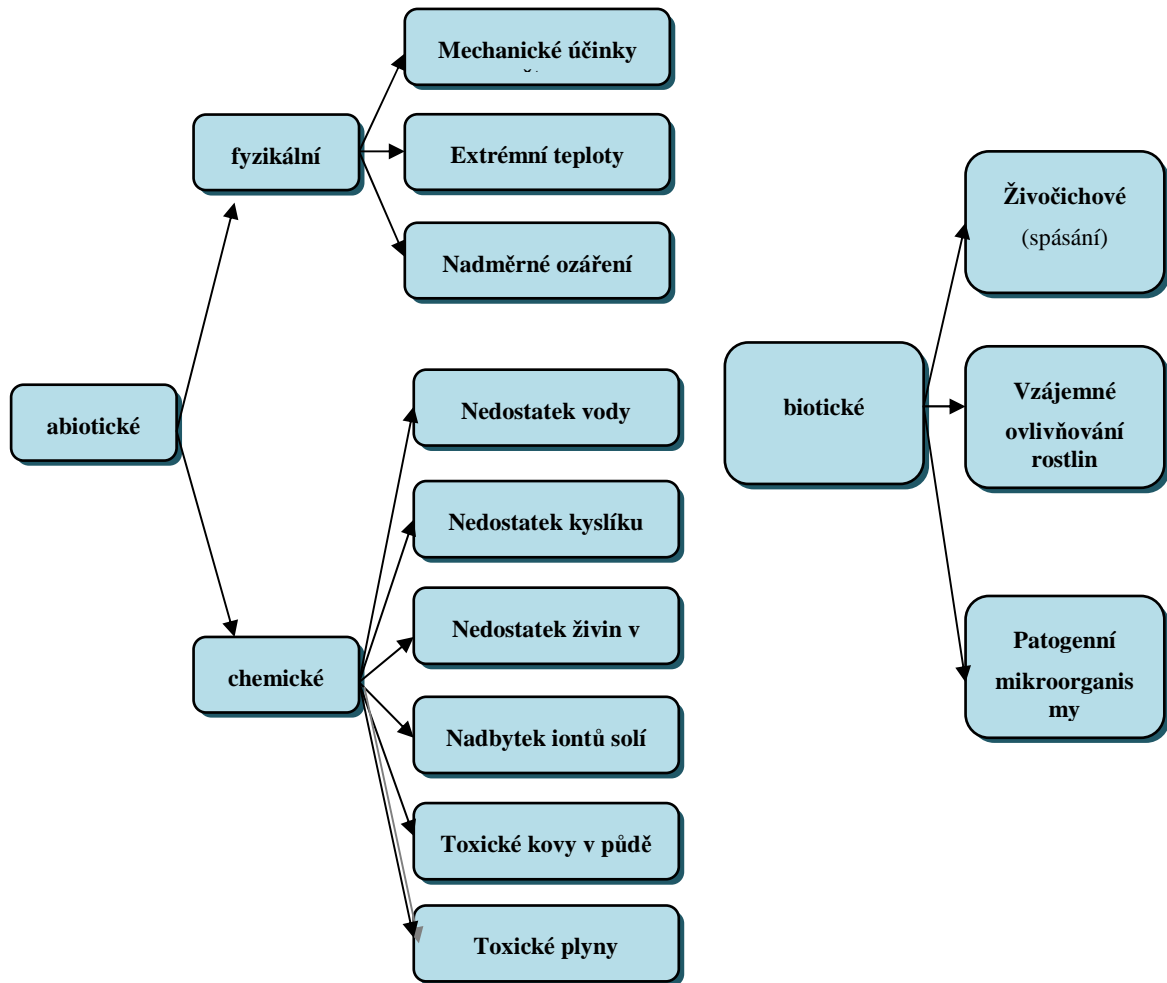
Rostliny produkují velké množství látek. U některých látek je známa jejich totální syntéza, ale u některých obsahových látek není dosud realizována s uspokojivým výsledkem (1). Rostlinné kultury, ale nejsou schopny sami o sobě produkovat velké množství těchto farmaceuticky významných látek, proto se využívají různé metody pro zvýšení jejich produkce. Jedná se hlavně o následující metody: (66)

- Elicitace
- Prekurzory
- Genetické inženýrství
- Imobilizace
- Biotransformace

3.3.1 Elicitace

Působením elicitoru na explantát dochází k rozvoji stresové reakce, která vede k produkci určitých sekundárních metabolitů (64).

Elicitory se dělí na 2 základní skupiny, které se dále dělí. Jejich detailní rozdělení vystihuje následující obrázek.



Obrázek 4: Rozdělení nejdůležitějších stresových faktorů (65)

3.3.2 Prekurzory

Vliv prekurzorů byl sledován i v kultuře *Hypericum perforatum*. Jako prekurzory byly použity aminokyseliny valin a izoleucin, které se účastní tvorby postranních acylových řetězců hyperforinu a adhyperforinu. Byla zjištěna 3-7x vyšší produkce adhyperforinu při použití izoleucinu a 2x vyšší produkce adhyperforinu po aplikaci threoninu (67).

3.4 *Hypericum perforatum* a elicitace

Třezalka byla v minulosti podrobena různým elicitacním pokusům. Dříve se zaměřovaly na ovlivnění produkce nejvýznamnějších metabolitů zodpovědných za její antidepresivní efekt (hypericin, hyperforin). Nyní se studie zabývají i jinými obsahovými látkami.

V průběhu roku 2014 bylo publikováno hned několik studií zabývajících se elicitací třezalky.

V první studii byly jako elicitory použity různé polysacharidy (chitin, pektin, dextran). Studie se zaměřila na produkci fenolických látek, flavonoidů a míru antioxidační aktivity elicitovaných buněk. Došlo k inhibici jednoho z klíčových enzymů v tvorbě flavonoidů (chalcon-flavonizomeráza), ale na druhou stranu se zvýšila aktivita fenylalaninaminolyázy. Výsledkem bylo antagonistické postavení syntetických cest produkujících naftodianthrony na úkor flavonoidů. Bezprostřední (neenzymatická) antioxidační aktivita poklesla, ale enzymaticky zajištěná antioxidační aktivita byla naopak zvýšena (aktivace peroxidázy) (73).

Další studie se zmiňuje o působení *Agrobacterium tumefaciens*, ve které se sledoval hlavně antioxidační vliv třezalky na buňkách HepG2. Tyto buňky byly nejprve podrobeny oxidačnímu činidlu a poté byly kultivovány společně s methanolickým extraktem z třezalky (předem elicitovány). Výsledky ukazují, že antioxidační vlastnosti třezalky signifikantně zvyšují množství glutathionu (GSH) a snižují poškození DNA (až o 55 %) (74).

V roce 2013 byl sledován vliv salicylové kyseliny v koncentracích (0, 50, 100 a 250 μM) na produkci látek v suspenzní i kalusové kultuře *Hypericum perforatum*. Elicitor v suspenzní kultuře zvýšil produkci hypericinu a pseudohypericinu dvojnásobně (v porovnání s kontrolou), maximální koncentrace bylo dosaženo po 4 dnech od elicitace ve všech koncentracích elicitoru (93).

3.5 Cer a ostatní lanthanoidy

3.5.1 Charakteristika

Lanthanoidy tvoří skupinu 14 prvků zařazených v periodickém systému prvků za lanthanem. Celá skupina prvků si je vlastnostmi velmi podobná. Je to způsobeno hlavně velmi podobnou elektronegativitou, shodným oxidačním číslem (III). Nejvíce se vlastnostmi přibližují kovům alkalických zemin (podobnost elektronegativit) (68).

Vyskytují se rozptýleny v jiných ložiskách rud, proto je jejich koncentrace ve vyšších množstvích obtížná. Jsou silně elektropozitivní, většinou vytváří iontové sloučeniny. Je pro ně typická tzv. lanthanová kontrakce, kdy oproti rostoucímu protonovému číslu klesá jejich poloměr (75).

3.5.2 Bezpečnost ceru

Nejčastěji se sloučeniny ceru využívají v průmyslu pro zvýšení katalytické schopnosti běžných katalyzátorů (oxid titaničitý). S tím souvisí i rostoucí využití těchto nanočástic. Rostoucí využití těchto sloučenin vyvolává i řadu studií sledujících jejich bezpečnost.

V roce 2013 byla publikovaná studie sledující vliv ceru v půdě na kvalitu rýže. Studii byly podrobeny 3 typy rýže (s nízkým, středním a vysokým obsahem amylozy). Sledoval se hlavně vliv na nutriční hodnoty, antioxidační charakteristiku v neposlední řadě i náchylnost k akumulaci ceru. Zjistilo se, že více akumulovala rýže s nižším obsahem amylozy. S tím souvisí i nižší nutriční hodnoty (nižší obsah železa, síry, škrobu). I antioxidační aktivita byla nižší (69).

I ve vodním prostředí byl zkoumán vliv ceru na život zelených řas (*Chlamydomonas reinhardtii*). Zde došlo k poklesu fotosyntézy a vzestupu hladin reaktivních forem kyslíku uvnitř buněk (70).

Vzhledem k tomu, že se oxidy ceru začínají využívat v různých technologických odvětvích, vyvstává otázka, zda je naprosto neškodný pro lidské zdraví. V roce 2013 byla publikována studie sledující vliv oxidu ceru na pulmonální funkce, která ukázala, že oxidy ceru nemají žádnou akutní (za 24 hodin) ani chronickou toxicitu (za 3 měsíce) (81).

3.5.3 Využití ceru

Stabilizované nanočástice oxidu ceru byly zkoušeny v terapii nádorů. Vyznačují se antioxidačním efektem, díky němuž ochraňují zdravé buňky před reaktivními formami kyslíku vnikajícími při radioterapii. Tento ochranný efekt vykazují pouze u zdravých buněk, nádorově pozměněné nijak neochraňují (71).

Jeho antioxidační aktivita byla sledována i ve spojitosti s oxidačním stresem a následným poškozením endoteliálních buněk. Toto poškození vede k rozvoji aterosklerózy (72).

V posledních letech jsou oxidy ceru zkoumány v souvislosti se spalovacími motory. Nanočástice oxidu ceru výrazně zlepšují chod motoru, snižují emise i spotřebu paliva. Oxid ceru představuje vysoce odolnou, netoxickou a stabilní část, která vystupuje jako zásobárna kyslíku. Ten postupně uvolňuje za současné oxidace oxidu uhličitého. Zároveň je schopný kyslík znovu pohltit od oxidů dusíku a tím je převádět na méně problematický dusík (76).

3.5.4 Lanthanoidy a elicítace

Lanthanoidy byly v posledních letech využity také jako elicitory u *in vitro* kultur. V roce 2013 byla publikována studie zabývající se vlivem 4 kovů na produkci biomasy flavonoidů v suspenzní kultuře *Tetragonia tetraena*. Jako elicitor byly zkoumány následující prvky: stříbro, kadmium, měď a cer. Nejlepších výsledků dosahovala měď a cer. Produkce biomasy vzrostla 1,3-1,6x, produkce flavonoidů se zvýšila 1,6-1,8x (77).

O rok novější je studie sledující vliv distribuce ceru v rostlinném těle (*Elodea canadensis*), jeho vliv na fotosyntetické pigmenty, vliv na antioxidační enzymy. Výsledky ukazují, že se nejvíce kumuluje v buněčné stěně, v pektinu a celulóze (až o 84- 98 % celkového aplikovaného ceru). Současně došlo redukci (v různé míře) minerálů v médiu (vápník, draslík, hořčík, železo). Byl pozorován i nárůst reaktivních forem kyslíku (až o 850 % oproti kontrole), inhibice určitých antioxidačních enzymů (glutathion reductáza), ale zároveň aktivace jiných enzymů (kataláza) (78).

Lanthanoidy byl v minulosti elicitován i rod *Taxus*. Sledoval se vliv různých iontů (Ce^{3+} , Ce^{4+} , La^{3+}) na produkci taxolu v kultuře *Taxus cuspidata*, kde se ukázalo, že nejlepších výsledků dosahuje Ce^{4+} po 2 dnech kultivace (79). Při zkoumání vlivu La^{3+} na různé druhy rodu *Taxus* se zjistilo, že lanthan je druhově specifický elicitor. Největší stimulace produkce taxolu se dosáhlo při přidávání La^{3+} ve 12. a 16. den od počátku kultivace (80).

V další studii byla sledována aktivita antioxidačních enzymů po stresu vyvolaném působením La^{3+} na kulturu *Glycine max*. Při nižších koncentracích elicitoru (0,06 mmol/l) nedocházelo k žádnému ovlivnění enzymů (kataláza, peroxidáza). Při 3x vyšší koncentraci (0,18 mmol/l) už jejich aktivita vzrůstala. Při ještě vyšší koncentraci (0,85 mmol/l) aktivita katalázy klesala, ale peroxidáza neustále rostla. Společně rostlo i množství peroxidu vodíku (16,4 %; 64,4 %). Při nižších koncentracích se růst biomasy zvyšoval, při vyšších koncentracích se naopak snižoval (82).

U následujících rostlin se zjišťoval vliv ceru (jeho akumulace) na kvalitu plodů: *Solanum lycopersicum* (84), *Glycine max* (83), *Oryza sativa* (69).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Přístroje a vybavení*

- Analytické váhy Sartorius PRLT A 1
- Vodní lázeň, typ 1042 GFL
- Box s laminárním prouděním, Fatran LF
- Horkovzdušný sterilizátor, Chirana SVS9/1
- Autokláv, PS 20A Chirana
- Třepačky, IKA KS 260 Basic, Heidolph Pkomax 2020
- Sušárna HS 61A Chirana
- Vialky Labicom s.r.o. Olomouc
- Mikrofiltry 0,45 μ m, Tessek
- Kapalinový chromatograf JASCO AS 2055 Plus
- Kolona Li Chrospher RP-18 125-4, sorbent Li Chrospher 5 μ m
- Termostat kolony Jetstream 2 Plus
- Pumpa Jasco PU-2089 Plus
- Autosampler Jasco AS-2055 Plus
- Diodový detektor Jasco MD- 2015
- Běžné laboratorní sklo

4.2 *Chemikálie*

- Destilovaná voda R
- Ajatin
- Ethanol 96%
- Methanol R 80%
- Acetonitril R
- Kyselina fosforečná R
- Složky živného média
- Růstový regulátor- kyselina α -naftyloctová (α -NAA)

4.3 Rostlinný materiál

Byly použity kalusové a suspenzní kultury *Hypericum perforatum* L. ve 116.- 121. pasáži.

4.4 Složení a příprava živného média

Celá kultivace probíhala na živném médiu podle Murashige and Skooga sestaveného podle následujícího schématu (85). Všechny složky byly naváženy na analytických vahách a kvantitativně převedeny do 1 000 ml odměrné baňky. Nakonec bylo přidáno 1 ml kyseliny α -naftyloctové (růstový regulátor) v koncentraci 10 mg/ml. Složky, které jsou obsaženy ve velmi malých množstvích, byly pipetovány ze zásobních roztoků. Do každé kultivační baňky bylo nalito 30 ml takto připraveného média.

| | Složky | mg/ l |
|---------------|--|---------|
| makroelementy | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 440,00 |
| | KNO ₃ | 1900,00 |
| | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 370,00 |
| | NH ₄ NO ₃ | 1650,00 |
| | KH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 170,00 |

| | složky | mg/ l |
|---------------|--|-------|
| mikroelementy | MnSO ₄ · 4H ₂ O | 22,30 |
| | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 11,50 |
| | H ₃ BO ₃ | 6,20 |
| | KI | 0,83 |
| | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,025 |
| | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0,25 |
| | CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0,025 |

| Železnatý komplex | Složky | mg/ l |
|-------------------|--------------------------------------|-------|
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27,84 |
| | Na ₂ EDTA | 37,34 |

| Vitamíny a další složky | Složky | mg/ml |
|-------------------------|---------------------|----------|
| | Pyridoxin | 0,50 |
| | Thiamin | 0,10 |
| | Kyselina nikotinová | 0,50 |
| | Sacharoza | 30000,00 |
| | Myo-inositol | 100,00 |
| | Hydrolyzát kaseinu | 1000,00 |

| Regulátor růstu | Název | |
|-----------------|---------------------------------------|-----------|
| | Kyseliny α-naftyloctová (α-NAA) | 10 mg/ ml |

Tabulka 3: Složení živného MS média (85)

4.5 Průběh kultivace

Kalusová kultura byla kultivována ve 100 ml Erlenmayerových baňkách na zpevněném živném médiu (můstek z filtračního papíru). Do každé baňky bylo nalito 30 ml živného média, baňka byla uzavřena hliníkovou fólií. Uzavřené baňky se vysterilizovaly v autoklávu při teplotě 121 °C, tlaku 100 kPa po dobu 20 minut.

Všechny baňky (s kulturami i bez nich) byly ořeny roztokem ajatinu, přeneseny do boxu s laminárním prouděním, kde probíhala veškerá manipulace s kulturami, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Box byl před samotným pasážováním vysvícen germicidní zářivkou a vydezinfikován 96% etanolem.

Pasážování **kalusových kultur** probíhalo v intervalu 5 týdnů. Pomocí vysterilizovaných pinzet se vždy přenesly 2-3 části kalusu do nové sterilní Erlenmayerovy baňky (obsahující zpevněné živné médium). Poté se baňky opět uzavřely hliníkovou fólií.

Následovala kultivace v kultivační místnosti za definovaných podmínek (25°C, 16 hodin světlo a 8 hodin tma).

Suspenzní kultura se připravila z kalusové mechanickým rozmělněním. Vzniklá suspenze se přenesla do připravených vysterilizovaných baněk s živným médiem, které se umístily do kultivační místnosti na třepačky (150 ot/min). Kultivace probíhala za stejných podmínek jako kultivace kalusové kultury po dobu 14 dní.

4.6 Příprava elicitoru

K pokusu byl použit abiotický elicitor- roztok chloridu ceritého o následujících koncentracích:

| Hmotnostní koncentrace (mg/100ml) | Molární koncentrace | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| 100 mg/ 100 ml | $4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ | C ₁ |
| 10 mg/ 100 ml | $4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ | C ₂ |
| 1 mg/100 ml | $4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ | C ₃ |

Tabulka 4: Koncentrace elicitoru

Roztok o koncentraci c₁ byl připraven navážením 100 mg chloridu ceritého a jeho rozpuštěním ve 100 ml odměrné baňce. Z takto připraveného roztoku se převedlo 10 ml do další odměrné baňky a naředilo do 100 ml, čímž se vytvořil roztok elicitoru o koncentraci c₂. Poslední roztok elicitoru se vytvořil odebráním 10 ml roztoku c₂ a následným naředěním do 100 ml odměrné baňky.

4.7 Vlastní elicitace

K elicitaci bylo použito 34 baňek s kulturami. Byly rozděleny do 2 skupin podle toho, zda byly podrobeny elicitaci (28 baňek) nebo zda elicitovány nebudou- kontrolní vzorky (6 baňek).

Všechny baňky byly před samotnou elitací ořeny roztokem ajatinu, poté byly přemístěny do předem vysvíceného boxu s laminárním prouděním, kde probíhala vlastní elicitace.

Do každé elicitované baňky byl přidán 1 ml elicitoru dané koncentrace. Do kontrolních vzorků (bez elicitace) byl přidán 1 ml destilované vody. Elicitace kalusových kultur probíhala po 5 týdnech kultivace, u suspenzních kultur po 14 dnech kultivace na třepačkách (150 ot/min).

Část vzorků (4 baňky) se odebrala ihned po elitaci, zbytek baňek (kontrolních i elicitovaných) bylo uloženo do kultivační místnosti (suspenzní kultury na příslušné třpačky se 150 ot/ min.). Další vzorky byly odebírány v předem definovaných časových intervalech: 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin od elicitace. Kontrolní vzorky byly odebírány po 24 a 168 hodinách.

Odebraný kalus byl usušen na filtračním papíře a následně podroben další analýze. Zároveň bylo odebráno i médium a zmrazeno pro další zpracování.

Shluky buněk suspenzní kultury byly zfiltrvány přes filtrační papír, usušeny a uschovány pro další analýzu. I ze vzorků suspenzních kultur byl odebrán a zmražen vzorek média.

4.8 Stanovení obsahu hyperosidu

4.8.1 Postup stanovení

Usušené vzorky kalusové i suspenzní kultury byly před vlastní analýzou rozdrobeny ve třecí misce a zváženy na analytických vahách.

Rozdrobněné vzorky byly vpraveny do 100 ml varné baňky společně s 10,0 ml 80% methanolu. Tato směs byla zahřívána 10 minut na vodní lázni po dobu 10 minut. Poté byla za tepla zfiltrována přes vatou do 25,0 ml odměrné baňky. Zbytek kultur

i s vatou byl znovu zahříván s 10,0 ml 80% methanolu na vodní lázni a opět zfiltrován. Oba filtráty byly spojeny ve 25,0 ml odměrné baňce, doplněny po rysku 80% methanolem a důkladně promíchány. Z takto připraveného roztoku bylo odebráno 1,7 ml a přes mikrofiltr (0,45 μm) vpraveno do připravené a řádně označené vialky.

Vzorky živného média byly rozmrazeny a dále odpařeny na vodní lázni do sucha. Odparek se poté rozpustil v 10,0 ml 80% methanolu, krátce zahřál na vodní lázni a přes vatou zfiltroval do připravené 10,0 ml odměrné baňky. Filtrát byl doplněn čistým 80% methanolem po rysku a promíchán. Připravený roztok (1,7 ml) byl přes mikrofiltr (0,45 μm) přefiltrován do připravených vialek.

4.8.2 Vlastní HPLC analýza

Připravené vzorky v označených vialkách byly podrobeny analýze na HPLC soustavě JASCO s následujícími parametry:

- Pumpa Jasco PU-2089 Plus
- Autosampler Jasco AS-2055
- Kolona MERCK LiChrospher RP-18 250x4 5 μm
- Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 μm
- Termostat kolony Jetstream II plus
- Diodový detektor Jasco MD- 2015
- Spínací napájecí zdroj MW7H380 GS Traveler + dvě elektrody

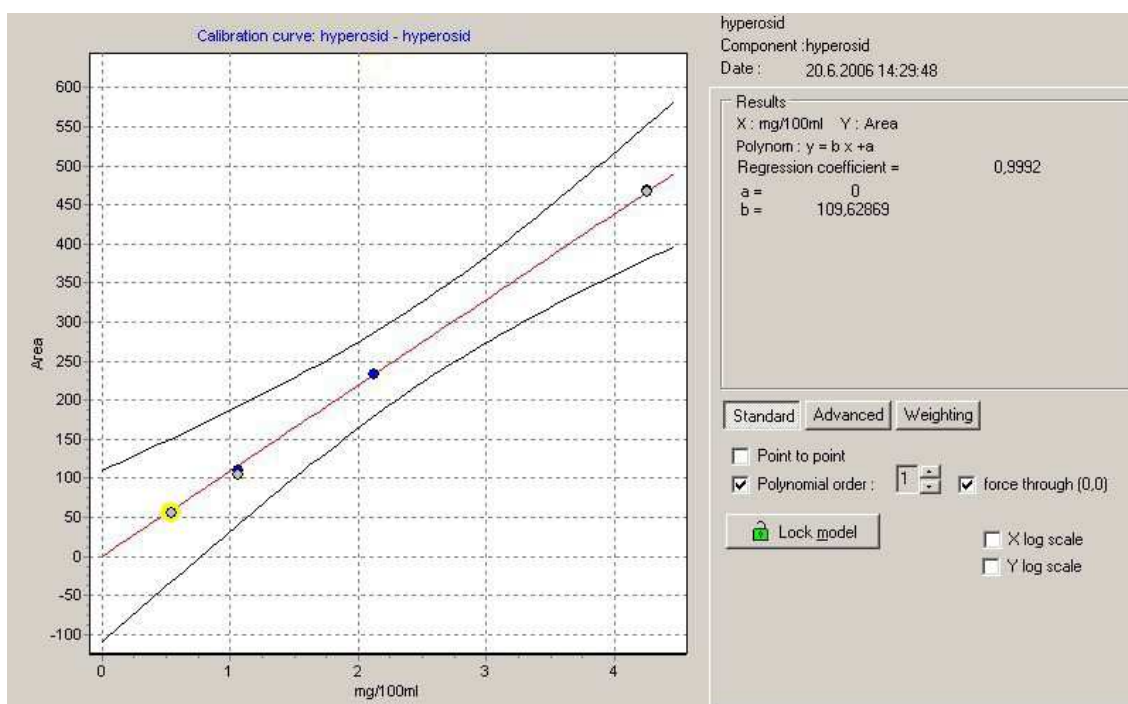
Parametry analýzy:

- Eluent A: 8% acetonitril s 0,15% fosforečnou kyselinou
- Eluent B: 100% acetonitril
- Rychlost průtoku: 1,5 ml/min.
- Detekce pomocí DAD detektoru v rozmezí 200-650 nm
 - Obsah vypočten z píku při 254 nm
- Množství nastříknutého vzorku: 20 μl
- Průběh eluce: prvních 12 minut probíhala izokraticky poté gradientově podle následujícího schématu:

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

Tabulka 5: Průběh HPLC analýzy

Kalibrační křivka byla vytvořena proměřením hyperosidu o známých koncentracích (4,25 mg/100 ml; 2,125 mg/100 ml; 1,062 mg/100 ml a 0,531 mg/100 ml). Z této křivky byl poté stanoven procentuální obsah hyperosidu (graf 1).



Graf 1: Kalibrační křivka při stanovení standardu hyperosidu

Obsah hyperosidu byl určen pomocí metody normalizace s následným porovnáním s kalibrační křivkou získanou měřením standardu hyperosidu.

4.9 Statistické zpracování dat (89)

Směrodatná odchylka vyjadřuje, jak se naměřené hodnoty liší od hodnoty průměrné (jak moc blízko této hodnotě leží). Určuje se podle následujícího vztahu:

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

s... směrodatná odchylka

x_i ... hodnota sledované veličiny

\bar{x} ... průměrná hodnota sledované veličiny

n... počet členů souboru

K určení statistické významnosti bylo použito testovací kritérium, pro které platí následující vztah: (92)

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

t.....testovací kritérium

\bar{x}_1 ... aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2 ... aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 ... směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 ... směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 ... počet členů kontrolního souboru

n_2 ... počet členů pokusného souboru

S testovacím kritériem se pojí t-rozdělení se stupněm volnosti určeného podle následujícího vztahu:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Výpočtem určená hodnota testovacího kritéria se porovná s tabelovanou kritickou hodnotou $t(v)_p$, pro daný stupeň volnosti (v) a hladinu významnosti p . Je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota, považujeme výsledky za statisticky významné.

Stanovení bylo provedeno vždy z 3 paralelních měření, ze kterých vyplývá následující:

- počet členů souboru $n_1 = n_2 = 3$
- počet stupňů volnosti $v = 4$

Výše zmíněným parametrům ($p = 0,05; v = 4; n_1 = n_2 = 3$) odpovídá kritická hodnota $t(v)_p = 2,78$. Pro určení testovacího kritéria v časovém intervalu odběru vzorků 0, 6, 12, 24, 48 hodin byly použity hodnoty kontroly 24 K. Pro interval odběru 72 a 168 hodin byly použity hodnoty kontroly 168K.

5 VÝSLEDKY

5.1 Tabulky

Tabulka 6: Množství hyperosidu (mg/g DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci $CeCl_3$ v různých koncentracích.

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu (mg/g DW) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|---|-------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
| 100 mg/ 100 ml C₁ | 0 | 0,16 | 0,0450 | 4,2866 |
| | 6 | 0,12 | 0,0450 | 1,8371 |
| | 12 | 0,18 | 0,0450 | 5,5114 |
| | 24 | 0,09 | 0,0450 | 0,0000 |
| | 24K | 0,09 | 0,0450 | - |
| | 48 | 0,21 | 0,0450 | 7,3485 |
| | 72 | 0,11 | 0,0450 | 3,6742 |
| | 168 | 0,04 | 0,0450 | 0,6124 |
| | 168K | 0,05 | 0,0450 | - |
| 10 mg/ 100 ml C₂ | 0 | 0,11 | 0,0795 | 2,4495 |
| | 6 | 0,20 | 0,0795 | 7,9608 |
| | 12 | 0,16 | 0,0795 | 5,5114 |
| | 24 | 0,03 | 0,0795 | 2,4495 |
| | 24K | 0,07 | 0,0795 | - |
| | 48 | 0,27 | 0,0795 | 12,2474 |
| | 72 | 0,16 | 0,0795 | 1,8371 |
| | 168 | 0,05 | 0,0795 | 4,8990 |
| | 168K | 0,13 | 0,0795 | - |

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu (mg/g DW) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
| 1 mg/ 100 ml C ₃ | 0 | 0,06 | 0,0372 | 3,0619 |
| | 6 | 0,09 | 0,0372 | 1,2247 |
| | 12 | 0,06 | 0,0372 | 3,0619 |
| | 24 | 0,07 | 0,0372 | 2,4495 |
| | 24K | 0,11 | 0,0372 | - |
| | 48 | 0,15 | 0,0372 | 2,4495 |
| | 72 | 0,13 | 0,0372 | 3,6742 |
| | 168 | 0,07 | 0,0372 | 0,0000 |
| | 168K | 0,07 | 0,0372 | - |

K= kontrolní vzorky (bez působení elicitoru)

Tabulka 7: Obsah hyperosidu v médiu suspenzní kultury *Hypericum perforatum* (mg/100 ml) po elicitaci pomocí $CeCl_3$.

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu (mg/100 ml) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| 100 mg/ 100 ml C ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu (mg/100 ml) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|---|-------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| 10 mg/100 ml C₂ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

| | | | | |
|---|------|---|---|---|
| 1 mg/ 100 ml C₃ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

K= kontrolní vzorky (bez působení elicitoru)

Vzhledem k žádnému uvolňování hyperosidu do živného média nebyly výsledky dále zpracovány v grafech.

Tabulka 8: Množství hyperosidu (mg/g DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci $CeCl_3$ v různých koncentracích.

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu ((mg/g DW) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|--|-------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|
| 100 mg/100 ml C₁ | 0 | 0,02 | 0,0198 | 1,2247 |
| | 6 | 0,01 | 0,0198 | 2,4495 |
| | 12 | 0,02 | 0,0198 | 1,2247 |
| | 24 | 0,05 | 0,0198 | 2,4495 |
| | 24K | 0,03 | 0,0198 | - |
| | 48 | 0,06 | 0,0198 | 3,6742 |
| | 72 | 0,01 | 0,0198 | 2,4495 |
| | 168 | 0,01 | 0,0198 | 2,4495 |
| | 168K | 0,03 | 0,0198 | - |
| 10 mg/ 100 ml C₂ | 0 | 0,01 | 0,0093 | 1,7321 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0,01 | 0,0093 | 1,7321 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0,02 | 0,0093 | 3,4641 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu (mg/g DW) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
| 1 mg/ 100 ml C₃ | 0 | 0,03 | 0,0098 | 5,1962 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

K= kontrolní vzorky (bez působení elicitoru)

Tabulka 9: Obsah hyperosidu v médiu kalusové kultury *Hypericum perforatum* (mg/100 ml) po elicitaci pomocí $CeCl_3$.

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu (mg/100ml) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|---|-------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|
| 100 mg/ 100 ml C₁ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru vzorku (hod) | Obsah hyperosidu (mg/100 ml) | Směrodatná odchylka | Testovací kritérium |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| 10 mg/100 ml C₂ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

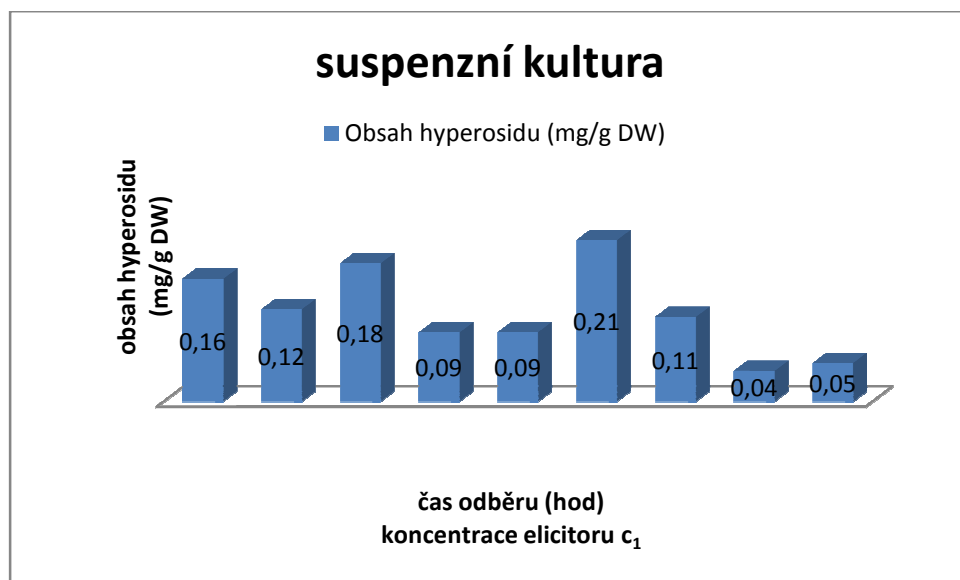
| | | | | |
|---------------------------------------|------|---|---|---|
| 1 mg/ 100 ml C₃ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 |
| | 24K | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 |
| | 168K | 0 | 0 | 0 |

K= kontrolní vzorky (bez působení elicitoru)

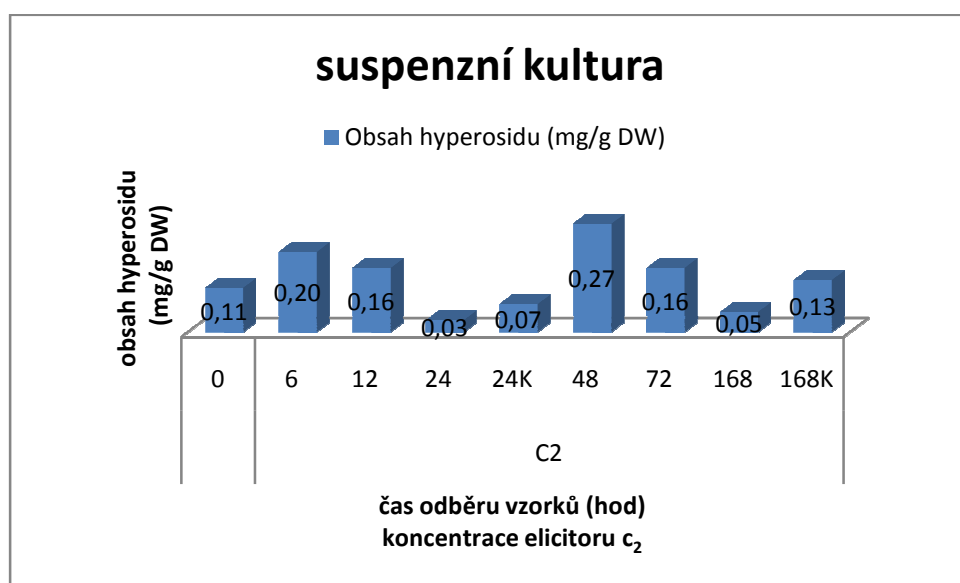
Nebylo pozorováno žádné uvolňování hyperosidu do živného média, proto nejsou výsledky zpracovány v grafech.

5.2 Grafy

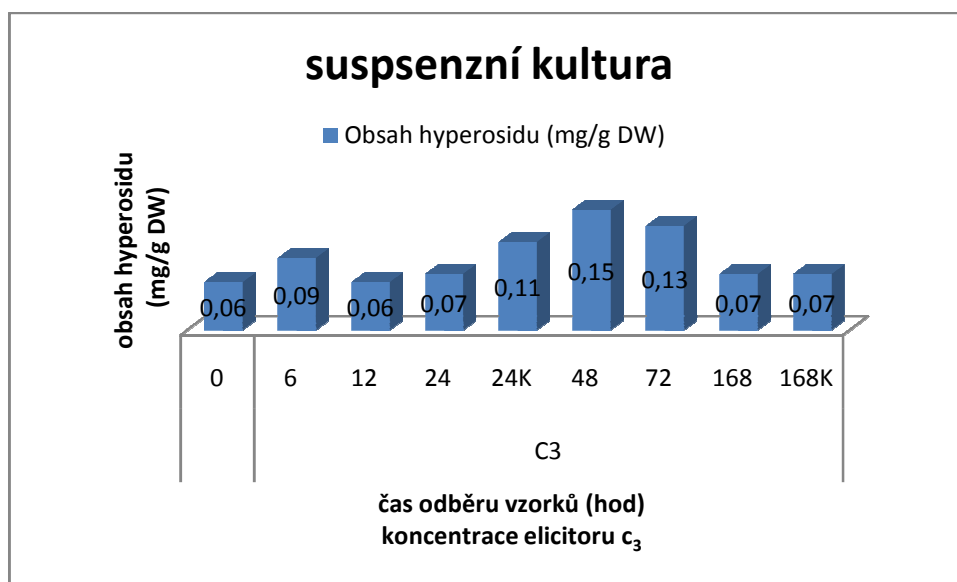
Graf 2: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci CeCl_3 v koncentraci c_1 ($4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$) v různých časových intervalech odběru vzorků.



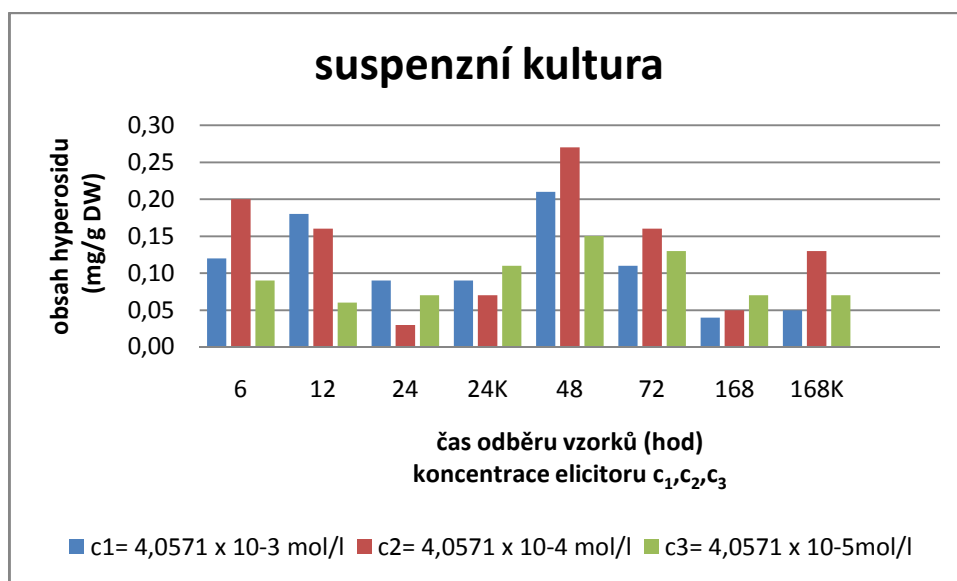
Graf 3: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci CeCl_3 v koncentraci c_2 ($4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) v různých časových intervalech odběru vzorků.



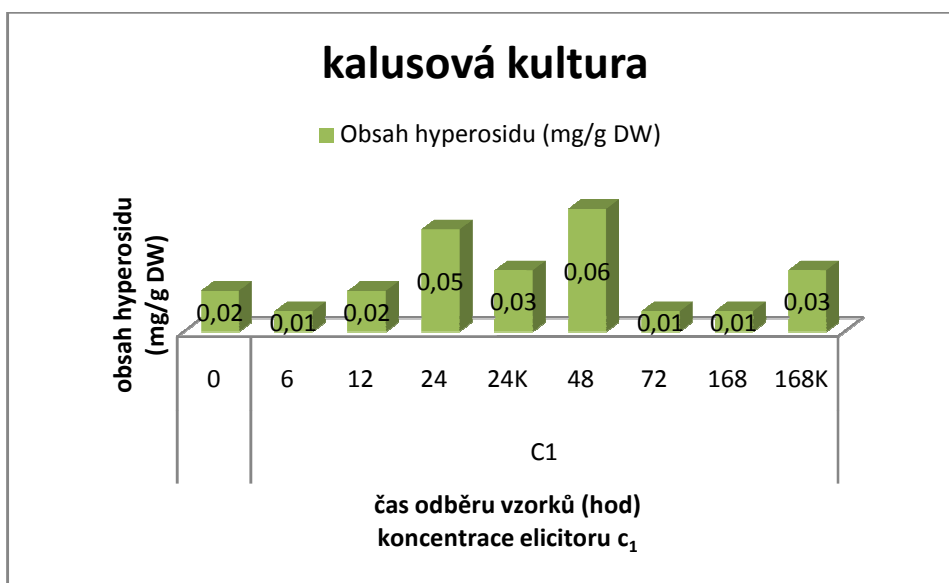
Graf 4: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci CeCl_3 v koncentraci c_3 ($4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) v různých časových intervalech odběru vzorků.



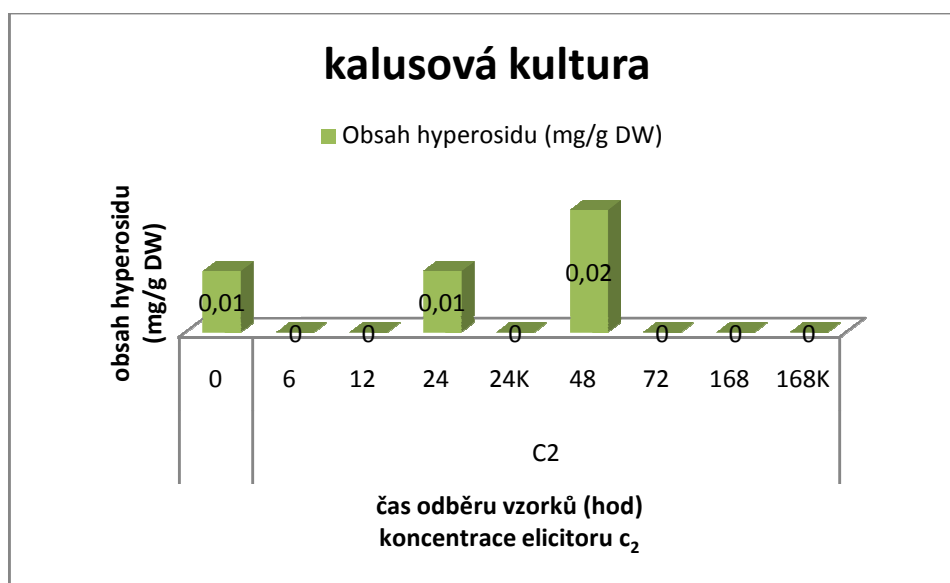
Graf 5: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci CeCl_3 v koncentraci c_1 ($4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$), c_2 ($4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) a c_3 ($4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) v různých časových intervalech odběru vzorků.



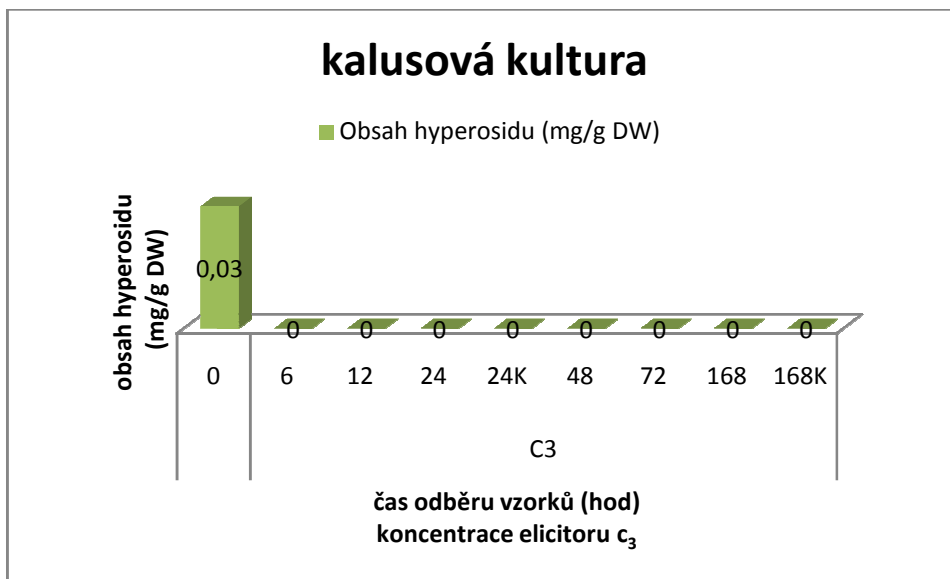
Graf 6: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci $CeCl_3$ o koncentraci $c_1(4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l})$ v různých časových intervalech odběru vzorků.



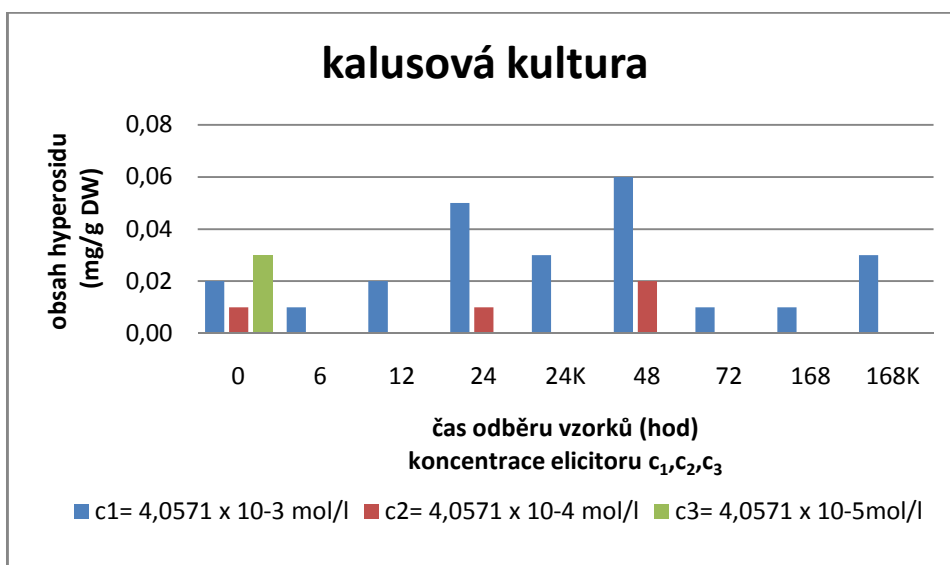
Graf 7: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci $CeCl_3$ o koncentraci $c_2(4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l})$ v různých časových intervalech odběru vzorků.



Graf 8: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci CeCl_3 o koncentraci c_3 ($4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) v různých časových intervalech odběru vzorků.



Graf 9: Obsah hyperosidu (mg/g DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* po elicitaci CeCl_3 v koncentraci c_1 ($4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$), c_2 ($4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) a c_3 ($4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) v různých časových intervalech odběru vzorků.



6 DISKUZE

Pomocí biotechnologických metod můžeme vhodně ovlivnit produkci žádaných sekundárních metabolitů rostlin. Hojně se v této oblasti využívají explantátové kultury. Sami o sobě se nevyznačují velkou produkcí sekundárních metabolitů, ale vhodně zvoleným elicitorem lze tuto produkci ovlivnit (91).

V této práci byla použita suspenzní i kalusová kultura *Hypericum perforatum* L. ve 116.- 121. pasáži. Byl sledován vliv abiotického elicitoru (CeCl_3) na produkci hyperosidu kalusovou i suspenzní kulturou o následujících koncentracích:

- $c_1 = 4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$
- $c_2 = 4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$
- $c_3 = 4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$

Současně bylo i pozorováno uvolňování hyperosidu do živného média. Vzorky byly hodnoceny pomocí metody HPLC.

Obě kultury byly kultivovány na živném médiu podle Murashigeho a Skooga s přídavkem 1,0 ml kyseliny α -naftyloctové (10 mg/ ml) jako růstového regulátoru. Kalusové kultury byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách na zpevněném živném médiu (můstek z filtračního papíru), suspenzní kultury na třepáčkách (150 ot/min) v kultivační místnosti (25 °C, 16 hodin světlo, 8 hodin tma).

Vzorky byly odebírány v pravidelných intervalech 0, 6, 12, 24, 48, 72, 168 hodin od elicitace. Současně byly odebrány i kontrolní vzorky (bez elicitace- s přídavkem 1 ml destivané vody) v intervalu 24 a 168 hodin od elicitace. Ve stejných časových intervalech byly odebírány i vzorky živného média. Následnou analýzou extraktů pomocí HPLC byl zjišťován obsah hyperosidu.

Suspenzní kultura

Koncentrace elicitoru c_1 ($4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$) ovlivnila produkci hyperosidu ve všech časových intervalech odběru vzorků. Statisticky významný nárůst obsahu hyperosidu byl zaznamenán ihned po elitaci, dále po 12, 48 a 72 hodinách od elicitace (viz tabulka 6). Obsah hyperosidu vykazoval rostoucí tendenci. Ihned po elitaci bylo zaznamenáno 0,16 mg/g DW hyperosidu. Po 12 hodinách od elicitace se obsah hyperosidu zvýšil na 0,18 mg/g DW. Maximální obsah způsobený koncentrací c_1 byl

zaznamenán po 48 hodinách, kdy bylo naměřeno 0,21 mg/g DW (133% nárůst oproti kontrolnímu vzorku), který po 72 hodinách klesl na 0,11 mg/g DW (viz tabulka 6, graf 2).

Elicitor o koncentraci c_2 ($4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l) způsobil statisticky významný nárůst obsahu hyperosidu po 6, 12 a 48 hodinách od elicitace. Po 6 hodinách byl zaznamenán obsah hyperosidu 0,2 mg/g DW. Po 12 hodinách došlo k poklesu obsahu hyperosidu na 0,16 mg/g DW. Maximální obsah hyperosidu při působení elicitoru o koncentraci c_2 ($4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l) byl zjištěn po 48 hodinách od elicitace (0,27 mg/g DW), což je 285% nárůst obsahu hyperosidu oproti kontrolnímu vzorku (viz tabulka 6, graf 3)

Produkce hyperosidu v suspenzní kultuře byla nejméně ovlivněna koncentrací elicitoru c_3 ($4,0571 \times 10^{-5}$ mol/l). Touto koncentrací elicitoru došlo pouze k 1 statisticky významnému nárůstu obsahu hyperosidu. Po 72 hodinách byl zaznamenán maximální obsah hyperosidu 0,13 mg/g DW (85% nárůst oproti kontrole) (viz tabulka 6, graf 4).

Produkce hyperosidu byla více ovlivněna v suspenzní kultuře, než v kalusové kultuře (graf 5,9). Tato skutečnost by se dala vysvětlit větším kontakterm buněk suspenzní kultury s živným médiem, jeho složkami i elicitem.

Produkce hyperosidu v suspenzní kultuře byla nejvíce ovlivněna elicitem o koncentraci c_1 ($4,0571 \times 10^{-3}$ mol/l) a c_2 ($4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l). Vlivem koncentrace c_1 došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu hyperosidu ve 4 vzorcích (0, 12, 48 a 72 hodin od elicitace) s maximálním procentuálním nárůstem obsahu 133 % zaznamenaným po 48 hodinách od elicitace. Elicitor o koncentraci c_2 způsobil statisticky významný nárůst obsahu hyperosidu pouze ve 3 vzorcích (po 6, 12 a 48 hodinách), ale jejich procentuální nárůsty jsou významnější než u koncentrace c_1 . Koncentrace c_2 také způsobila maximální nárůst hyperosidu v rámci celé suspenzní kultury zaznamenaný po 48 hodinách od elicitace (0,27 mg/g DW, což odpovídá 285% nárůstu oproti kontrole) (viz tabulka 6, graf 2,3,5).

Suspenzní kultury vykazovaly maximální obsah hyperosidu po 48 hodinách od elicitace. Výjimkou je koncentrace elicitoru c_3 ($4,0571 \times 10^{-5}$ mol/l), kdy po 48 hodinách nedocházelo ke statisticky významnému nárůstu obsahu hyperosidu (viz tabulka 6, graf 5).

Všechny kontrolní vzorky suspenzních kultur obsahovaly hyperosid. Jeho množství v porovnání s kalusovými kulturami bylo větší, což se opět dá vysvětlit větším kontaktem buněk suspenzní kultury se složkami živného média (viz tabulka 6,8, graf 5,9).

V průběhu analýzy nebylo pozorováno žádné uvolňování hyperosidu do živného média (viz tabulka 7).

Pro elicitaci suspenzní kultury je nejvhodnější použít elicitoru CeCl_3 o koncentraci $c_2 = 4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$, která způsobila po 48 hodinách od elicitace nárůst koncentrace hyperosidu o 285 % (0,27 mg/g DW) oproti kontrole (viz tabulka 6, graf 3).

Kalusová kultura

Statisticky významné ovlivnění produkce hyperosidu kalusovou kulturou bylo méně významné než u suspenzní kultury. Koncentrace elicitoru c_1 ($4,0571 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$) způsobila staticky významný nárůst obsahu hyperosidu pouze po 48 hodinách, kdy byl zaznamenán obsah hyperosidu 0,06 mg/g DW (100% nárůst oproti kontrole). Další zvýšení produkce způsobené koncentrací c_1 nebylo statisticky významné (viz tabulka 8, graf 6).

Elicitor o koncentraci c_2 ($4,0571 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) ovlivnil produkci hyperosidu pouze u 3 vzorků (0,24 a 48 hodin od elicitace). Statisticky významný nárůst obsahu hyperosidu byl zjištěn pouze po 48 hodinách od elicitace (0,03 mg/g DW což je 200% nárůst oproti kontrole, viz tabulka 8, graf 7).

Nejvyšší nárůst obsahu hyperosidu v kalusové kultuře byl způsoben elicitorem o koncentraci c_3 ($4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$). Ihned po elicitaci byl zaznamenán statisticky významný obsah hyperosidu 0,03 mg/g DW, což odpovídá 300% nárůstu obsahu hyperosidu oproti kontrole, viz tabulka 8, graf 8).

Kalusová kultura v porovnání se suspenzní kulturou se vyznačuje menší produkcí hyperosidu jak v kontrolních vzorcích (bez elicitace), tak při působení elicitoru CeCl_3 v různých koncentracích.

Maximální obsah hyperosidu v rámci kalusové kultury byl zaznamenán ihned po elicitaci působení elicitoru o koncentraci c_3 ($4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$), kde byl zjištěn obsah hyperosidu 0,03 mg/g DW (viz tabulka 8, graf 8, 9).

V průběhu analýzy nebyl zaznamenán žádný obsah hyperosidu ve vzorcích živného média (viz tabulka 9).

Pro elicitaci kalusové kultury je nejvhodnější koncentrace elicitoru $c_3 = 4,0571 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, která způsobila ihned po elitaci nárůst obsahu hyperosidu o 300 % (0,03 mg/g DW) oproti kontrole. (viz tabulka 8, graf 8).

Z výsledků lze usuzovat, že pro produkci hyperosidu kulturou *Hypericum perforatum* L. je vhodnější použít suspenzní kulturu, jejíž produkce byla ovlivněna ve většině časových intervalů odběrů vzorků (viz tabulka 6, graf 2, 5).

K podobnému závěru dospěla i Sojková, která elitulovala suspenzní i kalusovou kulturu *Hypericum perforatum* L. pomocí SeO_2 . Vliv elicitoru na produkci flavonoidů byl znatelnější u suspenzní než u kalusové kultury (94).

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit vliv chloridu ceritého (CeCl_3) na produkci hyperosidu kalusovou a suspenzní kulturou *Hypericum perforatum* L. Dále bylo sledováno i uvolňování hyperosidu do živného média.

Byly zjištěny následující výsledky:

- Vliv elicitoru na produkci hyperosidu byl výraznější v suspenzní kultuře.
- Suspenzní kulturu nejvíce ovlivnil elicitor o koncentraci c_1 ($4,0571 \times 10^{-3}$ mol/l) a c_2 ($4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l).
- Nejvyšší obsah hyperosidu byl pozorován v suspenzní kultuře při působení elicitoru o koncentraci $c_2 = 4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l, kde byl po 48 hodinách od elicitace zjištěn obsah hyperosidu $0,27$ mg/g DW, což představuje 285% nárůst produkce hyperosidu.
- Vysoká produkce hyperosidu v suspenzní kultuře byla zaznamenána také po 48 hodinách od elicitace působením koncentrace $c_1 = 4,0571 \times 10^{-3}$ mol/l ($0,21$ mg/g DW) a $c_2 = 4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l ($0,27$ mg/g DW).
- Koncentrace $c_3 = 4,0571 \times 10^{-5}$ mol/l vyvolala maximální produkci hyperosidu po 72 hodinách od elicitace ($0,13$ mg/g DW).
- Největší množství hyperosidu v kalusové kultuře bylo detekováno při působení elicitoru o koncentraci $c_1 = 4,0571 \times 10^{-3}$ mol/l po 48 hodinách od elicitace ($0,06$ mg/g DW)
- V suspenzní ani kalusové kultuře nedocházelo k uvolňování hyperosidu do živného média

8 ZDROJE

1. Iburg A. Lexikon přírodní medicíny: Obsahové látky, léčebné účinky, užití. 1. vydání. Dobřejovice: Rebo; 2006, 9-10,16-17.
2. Canedy D. Real medicine or medicine sideshow?. New York Times. 1998;23:C.
3. Státní ústav pro kontrolu léčiv [Internet]. Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2015 [cited 2015 Jan 2]. Available from: www.sukl.cz
4. Janů L., Racků S. Jak správně poznat a léčit depresi. Medicína pro praxi. 2007(1):24–27.
5. Navrátilová Z. Antidepresiva přírodního původu. Praktické lékárenství. 2011(7):191–194.
6. Gleason HA., Cronquist A. Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada. 2. vydání. Bronx, N.Y.: New York Botanical Garden; 1991,
7. Janča J., Zentrich A. Herbář léčivých rostlin 5.díl. 1. vyd. Praha: Eminent; 1997, 40-43.
8. Treben M. Zdraví z Boží lékárny: Léčivé byliny, rady a zkušenosti. 43. vydání. České Budějovice: Dona; 1991, 46-47.
9. Kolektiv autorů. Český lékopis 2009. Praha: Grada Publishing a.s.; 2009, 2294.
10. Foster S., Duke JA. Peterson Field Guide to Eastern/ Central Medicinal Plants and Herbs. New York: Houghton Mifflin Company; 2000, 128-129.
11. Castleman M. The New Healing Herbs: The Classic Guide to Nature's Best Medicines Featuring the Top 100 Time-Tested Herbs. New York: Rodale Press; 2001, 354-358.
12. Redvers A., Laugharne R., Kanagaratnam G., Srinivasan G. How many patients self-medicate with St John's wort?. Psychiatric Bulletin. 2001;25(7):254–256.
13. Clement K., Covertson CR., Johnson MJ., Dearing K. St. John's Wort and the treatment of mild to moderate depression: A systematic review. Holistic Nursing Practice. 2006;20(4):197–203.
14. Nahrstedt A., Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. Pharmacopsychiatry. 1997;30(2):129–134.

15. Wyk BE., Wink M. Medicinal plants of the world. Portland: Timber Press; 2005, 175.
16. Švestka J. Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* Linn.)- Rostlinné antidepresivum. Psychiatrie. 2002;6(2):109–120.
17. Patočka J., Strunecká A. Standardizovaný extrakt třezalky tečkované: Nové rostlinné antidepresivum. Vojenské zdravotnické listy. 2003;72(3):114–118.
18. Klemow KM., Bartlow A., Crawford J., Kocher N., Shah J., Ritsick M. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2. vydání. Boca Raton: CRC Press; 2011, 11. kapitola.
19. Petrich JW. Excited-state intramolecular H-atom transfer in nearly symmetrical perylene quinones: Hypericin, hypocrellin, and their analogues. International Reviews in Physical Chemistry. 2000;19(3):479–500.
20. Nicolaou KC., Carenzi GEA., Jeso V. Construction of highly functionalized medium-sized rings: Synthesis of hyperforin and perforatumone model systems. Angewandte Chemie. 2005;44(25):3895–3899.
21. Liu F., Pan C., Drumm P., Ang CYW. Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: Active constituents and their transformation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005;37(2):303–312.
22. Singer A., Wonnemann M., Müller WE. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1999;290(3):1363–1368.
23. Müller WE., Singer A., Wonnemann M. Hyperforin-antidepressant activity by a novel mechanism of action. Pharmacopsychiatry. 2001;34(1):S98–102.
24. Müller WE. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. Pharmacological Research. 2003;47(2):101–109.
25. Treiber K., Singer A., Henke B., Müller WE. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). British Journal of Pharmacology. 2005;145(1):75–83.
26. Teufel-Mayer R., Gleitz J. Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. Pharmacopsychiatry. 1997;30(2):113–136.

27. Laakmann G., Schüle C., Baghai T., Kieser M. St. John's wort in mild to moderate depression: The relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*. 1998;31(1):54–59.
28. PubChem [Internet]. PubChem. [cited 2015 Jan 22]. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hyperoside#section=Isomeric-SMILES>
29. Zeng KW., Wang XM., Ko H., Kwon HC., Cha JW., Yang HO. Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid β -protein via the PI3K/Akt/Bad/Bcl(XL)-regulated mitochondrial apoptotic pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2011;672(1-3):45–55.
30. Kim SJ., Um JY., Lee JY. Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor- κ B activation in mouse peritoneal macrophages. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(1):171–181.
31. Zhu W., Xu Y., Feng Y., Peng B., Che J., Liu M. Prophylactic effects of quercetin and hyperoside in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urolithiasis*. 2014;42(6):519–526.
32. Li W., Liu M., Xu YF., Feng Y., Che JP., Wang GC. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncology Reports*. 2014;31(1):117–124.
33. Yang FQ., Liu M., Li W., Che JP., Wang GC., Zheng JH. Combination of quercetin and hyperoside inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via regulation of microRNA-21. *Molecular Medicine Reports*. 2015;11(2):1085–1092.
34. Del Follo-Martinez A., Banerjee N., Li X., Safe S., Mertens-Talcott S. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. *Nutrition and Cancer*. 2013;65(3):494–504.
35. Stojanović G., Đorđević A., Šmelcerović A. Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's wort (*Hypericum perforatum*)? *Current Medicinal Chemistry*. 2013;20(18):2273–2295.
36. Greeson JM., Sanford B., Monti DA. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): A review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*. 2001;153(4):402–414.

37. Hypericum Depression Trial Study Group. Effect of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in major depressive disorder: A randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;287(14):1807–1814.
38. Bystrov NS., Chernov BK., Dobrynin VN., Kolosov MN. The structure of hyperforin. *Tetrahedron Letters*. 1975;16(32):2791–2794.
39. Diwu Z. Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochemistry and Photobiology*. 1995;61(6):529–539.
40. Lenard J., Rabson A., Vanderoef R. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: inhibition of fusion and syncytia formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(1):158–162.
41. Schempp CM., Kirkin V., Simon-Haarhaus B., Kersten A., Kiss J., Termeer CC. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(8):1242–1250.
42. Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W., de Witte PAM. Hypericin in cancer treatment: More light on the way. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2002;34(3):221–241.
43. Höpfner M., Maaser K., Theiss A., Lenz M., Sutter APOD., Kashtan H. Hypericin activated by an incoherent light source has photodynamic effects on esophageal cancer cells. *International Journal of Colorectal Disease*. 2003;18(3):239–247.
44. Roscetti G., Franzese O., Comandini A., Bonmassar E. Cytotoxic activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 erythroleukemic cells: Differential effects between methanolic extract and hypericin. *Phytotherapy research*. 2004;18(1):66–72.
45. Huang N., Rizshsky L., Hauck C., Nikolau BJ., Murphy PA., Birt DF. Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*. 2011;72(16):2015–2023.
46. Zdunić G., Godevac D., Milenković M., Vucićević D., Savikin K., Menković N. Evaluation of *Hypericum perforatum* oil extracts for an antiinflammatory and gastroprotective activity in rats. *Phytotherapy research*. 2009;23(11):1559–1564.

47. Hammer KDP., Hillwig ML., Solco AKS., Dixon PM., Delate K., Murphy PA. Inhibition of prostaglandin E(2) production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(18):7323–7331.
48. Griffith TN., Varela-Nallar L., Dinamarca MC., Inestrosa NC. Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17(5):391–406.
49. Silva B., Oliveira PJ., Dias A., Malva JO. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotoxicity Research*. 2008;13(3-4):265–279.
50. Zou YP., Lu YH., Wei DZ. Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytotherapy research*2010;24(1):S6–10.
51. Ku SK., Kwak S., Kwon OJ., Bae JS. Hyperoside inhibits high-glucose-induced vascular inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Inflammation*. 2014;37(5):1389–1400.
52. Galeotti N., Vivoli E., Bilia AR., Bergonzi MC., Bartolini A., Ghelardini C. A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St. John's Wort in mice. *The Journal of Pain*. 2010;11(2):149–159.
53. Ettler J., Ettler K.. Dětská kůže a fotosenzitivita. *Pediatric pro praxi*. 2014;15(3):128–130.
54. Malina L. *Fotodermatózy*. Praha: Maxdorf; 2005, 216.
55. Tůmová L., Bajarová J. *Hypericum perforatum*- Interakce s ostatními léky (II). *Praktické lékařství*. 2006;3:145–146.
56. Petráňová T. Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*) – Obstojí rostlinné antidepresivum v konkurenci ostatních antidepresiv?. *Remedia*. 2003;1(13):57–59.
57. Komoroski BJ., Zhang S., Cai H., Hutzler JM., Frye R., Tracy TS. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's Wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2004;32(5):512–518.
58. Fukunaga K., Orito K. Time-course effects of St John's Wort on the pharmacokinetics of cyclosporine in dogs: Interactions between herbal extracts

- and drugs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2012;35(5):446–451.
59. Hall SD., Wang Z., Huang SM., Hamman MA., Vasavada N., Adigun AQ. The interaction between St John's Wort and an oral contraceptive. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2003;74(6):525–535.
 60. Goey AKL., Meijerman I., Rosing H., Marchetti S., Mergui-Roelvink M., Keessen M. The effect of St John's Wort on the pharmacokinetics of docetaxel. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014 Jan;53(1):103–110.
 61. Johne A., Brockmöller J., Bauer S., Maurer A., Langheinrich M., Roots I. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1999;66(4):338–345
 62. Brenn A., Grube M., Jedlitschky G., Fischer A., Strohmeier B., Eiden M. St. John's Wort reduces beta-amyloid accumulation in a double transgenic Alzheimer's disease mouse model-role of P-glycoprotein. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*. 2014;24(1):18–24.
 63. Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1. přepr. vyd. Vydavatelství Univerzity Palackého; 1995, 1-29.
 64. Sikyta B. *Biotechnologie pro farmaceuty*. 3. vydání. Praha: Karolinum; 2001, 75-83.
 65. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3(13):1222–1239.
 64. Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003;37(Pt 1):91–102.
 65. Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šeberák J. *Fyziologie rostlin*. 1. vyd. Academia; 1998, 412-430.
 66. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3(13):1222–1239.

67. Karppinen K., Hokkanen J., Tolonen A., Mattila S., Hohtola A. Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*. 2007;68(7):1038–1045.
68. Jursík F. Anorganická chemie kovů. Praha: VŠCHT; 2002, 123-126.
69. Rico CM., Morales MI., Barrios AC., McCreary R., Hong J., Lee WY. Effect of cerium oxide nanoparticles on the quality of rice (*Oryza sativa* L.) grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(47):11278–11285.
70. Röhder LA., Brandt T., Sigg L., Behra R. Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium (III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 2014;152:121–130.
71. Zhang L., Jiang H., Selke M., Wang X. Selective cytotoxicity effect of cerium oxide nanoparticles under UV irradiation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2014;10(2):278–286.
72. Chen S., Hou Y., Cheng G., Zhang C., Wang S., Zhang J. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Biological Trace Element Research*. 2013;154(1):156–166.
73. Gadzovska Simic S., Tusevski O., Maury S., Delaunay A., Joseph C., Hagege D. Effects of Polysaccharide Elicitors on Secondary Metabolite Production and Antioxidant Response in *Hypericum perforatum* L. Shoot Cultures. *The Scientific World Journal*. 2014; Article ID 609649.
74. Carvalho AC., Franklin G., Dias ACP., Lima CF. Methanolic extract of *Hypericum perforatum* cells elicited with *Agrobacterium tumefaciens* provides protection against oxidative stress induced in human HepG2 cells. *Industrial Crops and Products*. 2014;59:177–183.
75. Lanthanoidy [Internet]. [cited 2015 Feb 3]. Available from: <http://is.muni.cz/el/1431/jaro2005/C2442/skripta/kapitola1602.html>
76. Torčík L. Nanotechnologická aditiva do paliv- Úspory a šetrnost k životnímu prostředí. *Chemagazin*. 2011;21(4):22–23.
77. Peng X., He JY. The inhibitory effect of Ca²⁺ on the flavonoid production of *Tetragium hemsleyanum* suspension cells induced by metal elicitors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2013;49(5):550–559.

78. Chu WY., Cai SJ., Fu YY., Li FF., Xu T., Qiu H. The toxicity of cerium nitrate to *Elodea canadensis*: subcellular distribution, chemical forms and physiological effects. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2014;36(9):2491–2299.
79. Yang S., Lu SH., Yuan YJ. Cerium elicitor-induced phosphatidic acid triggers apoptotic signaling development in *Taxus cuspidata* cell suspension cultures. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2009;159(1):13–20.
80. Wu JY., Wang CG., Mei XG. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp. cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*. 2001;85(1):67–73.
81. Domínguez A., Aristimuño C., Arriaga E., Aspiazú A., Suárez-Merino B., Goñi-de-Cerio F. Acute and subchronic pulmonary toxicity of cerium oxide nanoparticles for safety assessment. *Toxicology Letters*. 2013;221, Supplement:S239.
82. Liang C., Wang W. Antioxidant response of soybean seedlings to joint stress of lanthanum and acid rain. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013;20(11):8182–8191.
83. Lopez-Moreno ML., de la Rosa G., Hernandez-Viezcas JA., Castillo-Michel H., Botez CE., Peralta-Videa JR. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. *Environmental Science & Technology*. 2010;44(19):7315–7320.
84. Wang Q., Ma X., Zhang W., Pei H., Chen Y. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. *Metallomics*. 2012;4(10):1105–1112.
85. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497.
86. Hypericin [Internet]. ChemSpider- Search and share chemistry. [cited 2015 Feb 6]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444511.html?rid=e520f791-6b25-4800-962d-86bd2c45fd8e>
87. Hyperforin [Internet]. ChemSpider- Search and share chemistry. [cited 2015 Feb 6]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16736597.html?rid=b1d4216f-2608-4d75-adc7-5ea87707e936>

88. Hyperosid [Internet]. ChemSpider- Search and share chemistry. [cited 2015 Feb 6]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444962.html?rid=b7a9eb8f-7b33-428e-938d-d8e7e1330241>
89. Klemra P., Klemrová V. Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. Karolinum; 1993, 16-17, 22-27.
90. SUKL. Dodávky léčiv - se zaměřením na léčivé přípravky [Internet]. [cited 2015 Feb 19]. Available from: <http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-se-zamerenim-na-lecive-pripravky-1>
91. Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1. přepr. vyd. Vydavatelství Univerzity Palackého; 1995, 1-54.
92. Němečková E. Testování statistických hypotéz [Internet]. [cited 2015 Feb 19]. Available from: <http://slideplayer.cz/slide/1881501/>
93. Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Hagege D, Courtois D, et al. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2013;113(1):25–39.
94. Sojková K. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních látek v *in vitro* kulturách léčivých rostlin. Rigorózní práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové; 2014.

9 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakognosie

Kandidát **Mgr. Jitka Majerová**

Konzultant **Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.**

Název rigorózní práce ***Hypericum perforatum in vitro*- abiotická elicitace**

V této práci byl sledován vliv chloridu ceritého ve 3 různých koncentracích ($4,0571 \times 10^{-3}$ mol/l, $4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l, $4,0571 \times 10^{-5}$ mol/l) na produkci hyperosidu v suspenzní i kalusové kultuře *Hypericum perforatum* L. Vzorky byly odebírány v pravidelných intervalech 0, 6, 12, 24, 48, 72, 168 hodin od elicitace. Kontrolní vzorky (bez elicitace) byly odebírány po 24 a 168 hodinách od elicitace. Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC.

Chlorid ceritý ovlivňoval produkci hyperosidu jak v suspenzní, tak kalusové kultuře. Nejvyšší produkce (0,27 mg/g DW hyperosidu) byla dosažena v suspenzní kultuře po elicitaci koncentrací c_2 ($4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l) po 48 hodinách od elicitace.

Kalusová ani suspenzní kultura neuvolňovala hyperosid do živného média.

10 ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Farmacognosy

Candidate **Mgr. Jitka Majerová**

Consultant **Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.**

Title of Thesis ***Hypericum perforatum in vitro- abiotická elicitace***

The effect of cerium chloride at 3 different levels of concentration ($4,0571 \times 10^{-3}$ mol/l, $4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l, $4,0571 \times 10^{-5}$ mol/l) on production of hyperoside in cell and suspension culture of *Hypericum perforatum* L. was studied. The sample were taken after elicitation in fixed time period 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours after elicitation. The colntrol sample (without elicitor treatment) ware taken after 24 and 168 hours. The sample ware analysed by HPLC method.

Cerium chloride influenced hyperoside production in suspension and callus cultures. The highes content of hyperosid (0,27 mg/g DW) ware reached in suspension culture after cerium chloride treatment at concentration of c2 ($4,0571 \times 10^{-4}$ mol/l) after 48 hours.

Callus and suspension cultures did not release any hyperoside into nutrient medium.