

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakognozie**

Veronika Sedláčková

**Kultury léčivých rostlin *in vitro* – XVI**

Diplomová práce

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

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

Datum zadání: 26. 9. 2012

Oponent: PharmDr. Jan Martin, PhD.

Obhajoba: 3. 6. 2014

Počet stran: 67

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá použitá literatura a další zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Datum

Podpis

## Poděkování

Děkuji své školitelce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a pomoc při sestavování této diplomové práce a PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za pomoc při analýze vzorků pomocí HPLC.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	CÍL PRÁCE .....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
3.1	<i>Silybum marianum</i> .....	10
3.1.1	Základní informace .....	10
3.1.2	Ostropestřec mariánský od minulosti až po současnost .....	10
3.1.3	Rostlinné drogy .....	11
3.1.3.1	<i>Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum</i> – Ostropestřcový extrakt suchý čištěný a standardizovaný .....	11
3.1.3.2	<i>Silybi mariani fructus</i> – Plod ostropestřce mariánského .....	12
3.1.3.3	Sběr a úprava drogy .....	12
3.1.4	Obsahové látky .....	12
3.1.5	Biosyntéza silymarinu a jeho chemická struktura .....	13
3.1.6	Prokázané účinky ostropestřce mariánského .....	16
3.1.6.1	Hepatoprotektivní a choleretická aktivita .....	16
3.1.6.2	Protirakovinné účinky .....	16
3.1.6.3	Protizánětlivá aktivita .....	17
3.1.6.4	Použití v dermatologii a kosmetice .....	17
3.1.6.5	Efekt na produkci prolaktinu .....	17
3.1.6.6	Vliv na gastrointestinální trakt a <i>diabetes</i> .....	17
3.1.6.7	Neuroprotektivní aktivita .....	17
3.1.6.8	Ostatní .....	18
3.1.7	Indikace a použití silymarinu ve farmacii .....	18
3.2	Explantátové kultury .....	19
3.2.1	Z historie .....	19
3.2.2	Definice .....	19
3.2.3	Typy rostlinných explantátů .....	20
3.2.3.1	Kultury buněčných protoplastů .....	20
3.2.3.2	Buněčné kultury .....	20
3.2.3.3	Kalusové kultury .....	20
3.2.3.4	Suspenzní kultury .....	21

3.2.3.5	Orgánové kultury .....	21
3.2.4	Technika a podmínky kultivace.....	21
3.2.4.1	Laboratorní zařízení .....	21
3.2.4.2	Podmínky kultivace.....	21
3.2.5	Růstové regulátory rostlin .....	22
3.2.5.1	Auxiny.....	22
3.2.5.2	Cytokininy.....	23
3.2.5.3	Gibereliny.....	24
3.2.5.4	Kyselina abscisová (ABA) .....	24
3.2.5.5	Etylen.....	25
3.2.5.6	Polyaminy .....	25
3.2.5.7	Kyselina jasmonová .....	26
3.2.5.8	Brassinosteroidy .....	26
3.2.6	Kultivační média.....	26
3.2.6.1	Složení kultivačního média .....	26
3.2.6.2	Příprava kultivačního média .....	28
3.2.7	Využití explantátových kultur.....	28
3.3	Elicitace.....	28
3.3.1	Elicitory.....	29
3.3.1.1	Biotické elicitory .....	29
3.3.1.2	Abiotické elicitory.....	29
3.3.2	Mechanismus působení elicitorů.....	31
3.3.2.1	Stresové proteiny.....	32
3.3.2.2	Aktivní formy kyslíku .....	32
4	PRAKTICKÁ ČÁST.....	33
4.1	Rostlinný materiál .....	33
4.2	Použité pomůcky a chemikálie .....	33
4.2.1	Pomůcky .....	33
4.2.2	Chemikálie .....	33
4.3	Příprava pomůcek ke kultivaci .....	34
4.4	Příprava živného média.....	35
4.5	Pasážování .....	36
4.6	Příprava roztoku elicitoru .....	36

4.7 Elicitace.....	37
4.8 Příprava extraktů pro stanovení obsahu .....	37
4.9 Stanovení obsahu pomocí HPLC.....	38
4.9.1 Obecná charakteristika HPLC.....	38
4.9.2 Parametry HPLC analýzy .....	38
4.9.3 Kalibrační křivky.....	39
4.9.4 HPLC chromatogram standardu silymarinu .....	42
4.10 Statistické zpracování výsledků .....	42
5 VÝSLEDKY .....	44
5.1 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg. g <sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře <i>Silybum marianum</i> při použití třech různých koncentrací elicitoru .....	44
5.2 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg. g <sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i> při použití třech různých koncentrací elicitoru.....	45
5.3 Obsah silymarinového komplexu [mg.g <sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře <i>Silybum marianum</i> při použití třech různých koncentrací elicitoru a statistické zpracování výsledků.....	46
5.4 Obsah silymarinového komplexu [mg.g <sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i> při použití třech různých koncentrací elicitoru a statistické zpracování výsledků.....	47
5.5 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu kalusových kultur <i>Silybum marianum</i> při použití třech různých koncentrací elicitoru.....	48
5.6 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu suspenzních kultur <i>Silybum marianum</i> při použití třech různých koncentrací elicitoru.....	49
5.7 Grafické vyjádření obsahu silymarinového komplexu a taxifolinu v kalusové kultuře <i>Silybum marianum</i> po působení různých koncentrací elicitoru .....	50
5.8 Grafické vyjádření obsahu silymarinového komplexu a taxifolinu v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i> po působení různých koncentrací elicitoru .....	51
6 DISKUZE.....	52
7 ZÁVĚR.....	57
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	58
9 SEZNAM TABULEK .....	59
10 SEZNAM OBRÁZKŮ.....	60

11 SEZNAM GRAFŮ .....	61
12 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	62
13 ABSTRAKT.....	66
14 ABSTRACT.....	67

# 1 ÚVOD

Rostliny jsou pro člověka i v dnešní době, plně chemických a syntetických sloučenin, cenným zdrojem léčivých látek. Produkce léčivých rostlin a zejména izolace jejich sekundárních metabolitů k léčebným účelům je značně finančně i časově náročná a mnohdy ne moc produktivní. Organická syntéza rostlinných sekundárních metabolitů není mnohdy možná, jelikož se často jedná o složité mnohastupňové biosyntetické reakce, což by bylo pro účely využití v medicíně a farmacii finančně neúnosné.

Jednou z možností, jak usnadnit získávání významných sekundárních metabolitů léčivých rostlin, je využití explantátových kultur. Kultivace *in vitro* je jednodušší a rychlejší než pěstování celých léčivých rostlin a navíc je možno snadno sledovat a ovlivňovat syntézu těchto sekundárních metabolitů. Produkce explantátových kultur je však bohužel velmi nízká a mnohdy ještě menší, než produkce léčivých látek matečnými rostlinami. Proto se hledají způsoby, které by ji mohly zvýšit. Jedna z možností, jak toho docílit, je metoda elicitace, která využívá vlivu tzv. elicitorů (stresorů). Podmínkou úspěšné elicitace, jejímž výsledkem je zvýšení produkce léčivých látek explantátovými kulturami, je nalezení správného druhu elicitoru o vhodné koncentraci a jeho optimální doby působení na tuto kulturu.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo seznámit se s technikou kultivace rostlinných explantátových kultur, zjistit vliv derivátu pyrazin-2-karboxamidu (jako abiotického elicitoru) na produkci flavonolignanů v explantátové kultuře *Silybum marianum* a na základě stanovení obsahu flavonolignanů metodou HPLC zjistit, zda je tento elicitor schopen ovlivnit jejich produkci v kultuře *in vitro*.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 *Silybum marianum*

#### 3.1.1 Základní informace

Název rostliny: *Silybum marianum*, (L.) Gaertn., ostropestřec mariánský

Oddělení: *Magnoliophyta*, krytosemenné rostliny

Třída: *Magnoliopsida*, dvouděložné rostliny

Řád: *Asterales*, hvězdicovité

Čeleď: *Asteraceae (Compositae)*, hvězdicovité (složenokvěté)

Podčeleď: *Asteroideae*

Popis: Jedná se o dvouletou bylinu s nápadnými ostnitými listy pokrytými bílými skvrnami, dolní listy jsou uspořádané v přízemní růžici. Květy tvoří úbory nachové barvy, které se objevují od července do září. Plody jsou nažky pokryté chmýřím složené z chloupků. Tyto plody tvoří významnou rostlinnou drogu (*Fructus cardui mariae*), bohatou na komplex účinných látek zvaný silymarin. (1; 2)

Obsahové látky: flavonolignany (silymarinový komplex), flavonoidy (taxifolin), hořčiny, silice, biogenní aminy, olej, fytosteroly. (2)

Rozšíření a stanoviště: Rostlina je původní ve Středomoří, Severní Africe a Západní Asii a roste většinou na skalnatých místech, pustinách a okrajích cest. Nyní je rozšířená i v mírných pásmech na dalších kontinentech, jako je Amerika a Austrálie. Rostlina je také pěstována v České republice. (3)

#### 3.1.2 Ostropestřec mariánský od minulosti až po současnost

Ostropestřec mariánský je léčivá rostlina, která je využívána v evropské tradiční medicíně již celá staletí. Poznatky o této rostlině se postupně rozšiřovaly a jeho použití rozvíjelo a nyní patří k jedněm z nejprozkoumanějších a nejvíce využívaných léčivých rostlin ve farmacii a medicíně. S oblibou je ostropestřec mariánský přidáván do fytopreparátů pro své blahodárné účinky na jaterní činnost, při poškození jater toxiny, alkoholem, viry, při jaterní cirhóze a akutní hepatidě. (4)

V Evropě byl ostropestřec využíván již před naším letopočtem a zmiňován v dílech mnoha významných autorů, např. v dílech Theophrasta, který pravděpodobně jako první popisoval tuto léčivou rostlinu pod názvem „*Pternix*“. Později v 1. století n. l. se objevily poznatky o této léčivé rostlině např. v nejznámějším díle Dioscurida *Materia medica* anebo v dílech římského filozofa Plinia. (5) V těchto dobách byl ostropestřec používán zejména při poruchách zažívání a žloutence. (6)

Jak již název této léčivé rostliny napovídá, ostropestřec mariánský je spjat již od středověku s mariánským kultem. V tradičních dobových herbářích, např. v dílech Petra Meliusa z roku 1578, byl uváděn jako lék při nechutenstvích a zažívacích obtížích. (4) V minulosti byla tato rostlina využívána také jako potravina a upravována stejně jako např. špenát a jeho plody byly praženy a zpracovávány podobně jako kávová zrna. (3)

Nezanedbatelné využití této léčivé rostliny bylo také v homeopatii německým lékařem S. Hahnemannem na počátku 19. století. Používala se *Tinctura cardui mariae*, která se uplatňovala též v léčbě onemocnění jater. (6)

V současnosti je ostropestřec mariánský pravděpodobně nejvíce známý pro své hepatoprotektivní působení. Silybin, hlavní komponenta silymarinového komplexu, je dále lékem první volby při otravách muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*). V této indikaci je však používán intravenózně a to ve velmi vysokých dávkách. Blahodárný účinek má také jeho preventivní užívání současně s farmakologickou léčbou, která může dlouhodobě nepříznivě ovlivňovat jaterní činnost. Obecně lze tedy říci, že ostropestřec mariánský je vhodný k léčbě nebo jako doplněk léčby všech jaterních onemocnění, ať už se jedná o chronické nebo akutní stavy, bez ohledu na příčinu. (4)

Hepatoprotektivní působení této léčivé rostliny není ale zdaleka jejím jediným blahodárným účinkem na lidský organizmus. V současných vědeckých studiích bylo prokázáno i její protinádorové působení, schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi a antioxidační aktivita. Prostřednictvím své antioxidační aktivity dokáže chránit kůži před škodlivými vlivy UV záření. Dále byl studován pozitivní vliv této rostliny na kardiovaskulární a nervový systém, zvláště u neuropatií a byl prokázán také protizánětlivý a imunomodulační efekt. (5)

Jedním z nejnovějších poznatků je schopnost této rostliny blahodárně působit při Alzheimerově chorobě, která byla zkoumána v nedávné čínské klinické studii (Yin et al., 2011). Hlavní úlohu zde hraje silybin, který zabraňuje tvorbě a hromadění  $\beta$ -amyloidu – bílkoviny, pravděpodobně zodpovědné za příčinu této choroby. (4)

Moderní vědecké studie tedy přinesly nové zajímavé poznatky, které mohou rozšířit oblast léčebného využití této cenné léčivé rostliny. Bude však potřeba ještě mnoha klinických studií, než se na základě těchto nových vědeckých poznatků rozšíří její léčebné indikace. V budoucnu bude zřejmě právě hypocholesterolemická, kardioprotektivní, neuroprotektivní a chemoprotektivní účinnost středem zájmu vědeckých studií a poznatky se v těchto oblastech budou dále prohlubovat. (7)

### 3.1.3 Rostlinné drogy

Dle Českého lékopisu 2009 tvoří drogu rostliny *Silybum marianum*:

#### 3.1.3.1 *Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum* – Ostropestřcový extrakt suchý čištěný a standardizovaný

Jedná se o suchý, čištěný a standardizovaný extrakt, který se získává z plodů rostliny *Silybum marianum*.

Vzhledem se jedná o žlutohnědý amorfnní prášek vyráběný různými postupy, při kterých se používá jedno nebo více z následujících rozpouštědel: ethyl-acetát, aceton, etanol, metanol nebo jejich směs s vodou. Droga obsahuje 30 % - 65 % silymarinu. (8)

### **3.1.3.2 *Silybi mariani fructus – Plod ostropestřce mariánského***

Jedná se o chmýru zbavený zralý plod rostliny *Silybum marianum*. Obsahuje minimálně 1,5 % silymarinu, počítaného jako silybin, vztaženého na suchou drogu. (8)

### **3.1.3.3 *Sběr a úprava drogy***

„Krátce před dozráním se celé chmýřité hlavice odřežou a v suchých, vzdušných prostorách se uloží k úplnému dozrání.“ Plody se následně zbaví chmýru. Takto upravená droga je připravena k použití. Je bez zápachu a hořké chuti. (2)

Plody se využívají buď ve formě odvaru nebo jako prášek či tinktura. (6)

### **3.1.4 *Obsahové látky***

Nejvíce ceněnou složkou této léčivé rostliny je směs flavonolignanů známá jako silymarin. Nejedná se tedy jen o jednu sloučeninu, ale sestává z komplexu několika účinných látek. (9) Silymarin je obsažen v plodech této rostliny v množství 1-3 %. (7) Silymarinový komplex je jedna z nejstudovanějších rostlinných obsahových látek vůbec a jeho účinky se zabývalo již nesčetné množství vědeckých studií, ačkoli jeho přesný mechanismus účinku nebyl dosud zcela úplně popsán. (9)

Přestože je ostropestřec mariánský jednou z nejdéle tradičně používaných léčivých rostlin v Evropě, obsahové látky zodpovědné za jeho blahodárny účinek byly studovány teprve relativně nedávno. (7) Chemická struktura silybinu byla např. identifikována až v roce 1975. (10)

Jak již bylo řečeno, silymarinový komplex je směsí flavonolignanů. Chemickým složením se jedná o polyfenoly. Komplex je složen z následujících látek - silybin, isosilybin, silychristin a silydianin. Tyto látky tvoří izomerickou směs. (11) Za nejaktivnější složku je považován silybin (syn. silibinin), který je zde také obsahově nejvíce zastoupen, konkrétně z 60 - 70 %. (12) Silybin je směsí dvou diastereoizomerů A a B v poměru přibližně 1:1. (4)

Dalšími flavonolignany nalezenými v semenech této rostliny jsou dehydrosilybin, deoxysilychristin, deoxysilydianin, silandrin, silybinom, silyhermin a neosilyhermin. Neopomenutelnou složkou palety obsahových látek jsou flavonoidy taxifolin, apigenin a silybonol a také hořčiny, silice a biogenní aminy. Součástí plodů je také cca 20 % oleje složeného z fosfolipidů, kyseliny linolové, olejové, myristové, palmitové a stearové (5; 10; 11). Dalšími složkami plodů jsou kvercetin, dihydrokempferol, kempferol, naringenin, eriodiktin, chrysoeriol, 5, 7 - dihydroxychromon, dále steroly stigmasterol, kampesterol a sitosterol. (2; 11)

### 3.1.5 Biosyntéza silymarinu a jeho chemická struktura

Silymarinový komplex lze získat extrakcí přímo z rostliny nebo explantátové kultury nebo ho lze připravit biosynteticky.

Základními reakčními složkami biosyntézy silymarinového komplexu je konyferylalkohol a flavanol taxifolin. Tohoto poznatku lze využít např. ke zvyšování produkce flavonolignanů u explantátových kultur *Silybum marianum*, a to přidávkem koniferylalkoholu vázaného např. na cyklodextrin do živného média. (5)

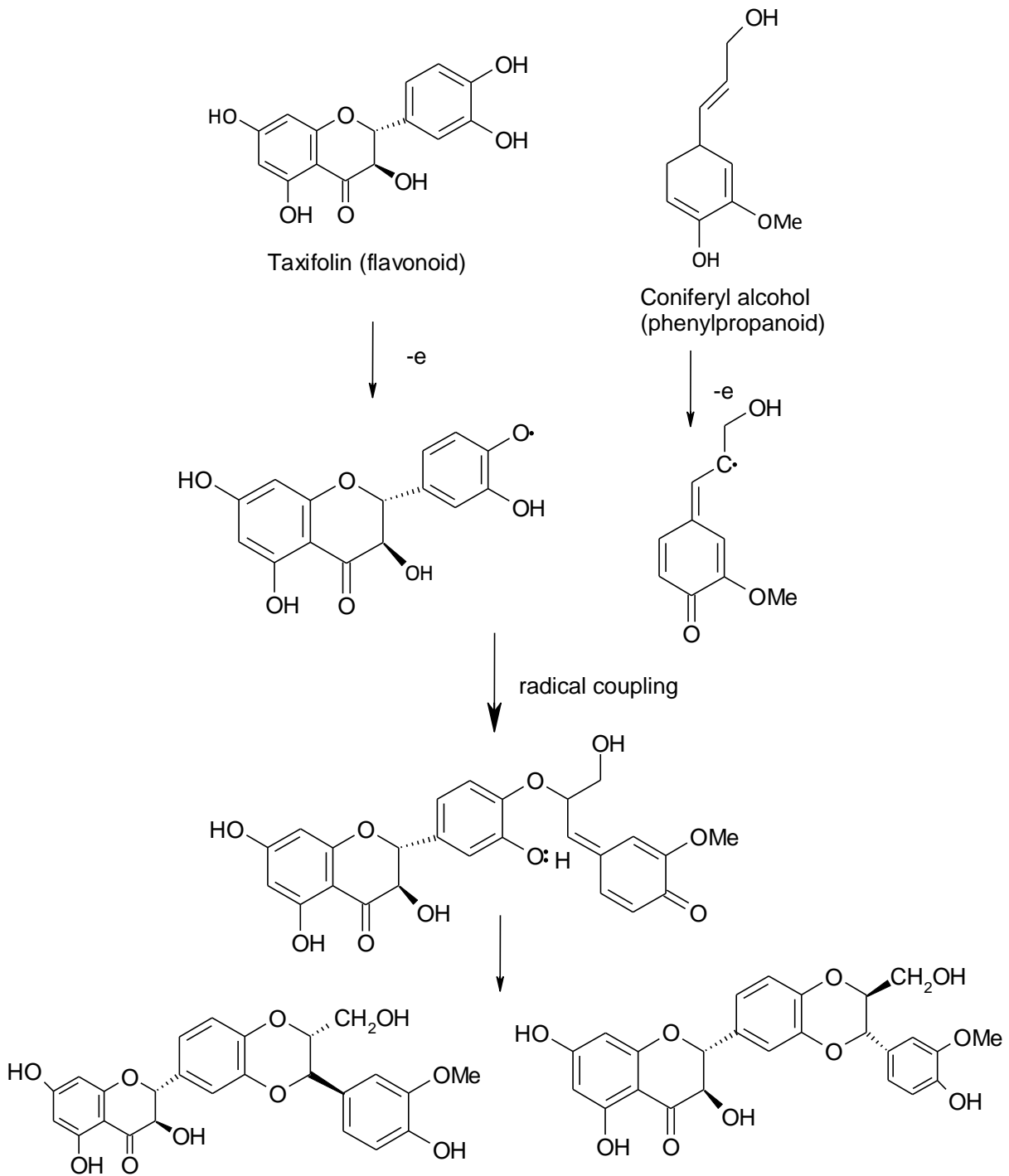
Složky silymarinového komplexu mohou být tedy biosyntetizovány oxidační reakcí taxifolinu a konyferylalkoholu, a to za katalýzy enzymu peroxidázy. V průběhu reakce vznikají vysoce reaktivní radikály, které se mezi sebou následně párují. Dochází tak k reakci mezi volnými radikály vznikajícími z flavanolu taxifolinu a konyferylalkoholu. Produktem tohoto řetězce reakcí je silybin. Tento způsob získávání silymarinu je však značně náročný, a tudíž se s ním v praxi v podstatě nesetkáme. (10)

Viz Obrázek 1 *Biosyntéza silybinu*

Společnou strukturou všech flavonolignanů je tedy skelet složený z taxifolinu a konyferylalkoholu, tvořících oxeranový kruh, který je nosičem biologické aktivity. Otevřením tohoto kruhu se biologická aktivita ztrácí. Pouze silybin a isosilybin obsahuje ve své struktuře 1, 4 - dioxanový kruh. (5; 10) Silydianin má komplexnější strukturu tvořenou intramolekulární cyklizací. (10)

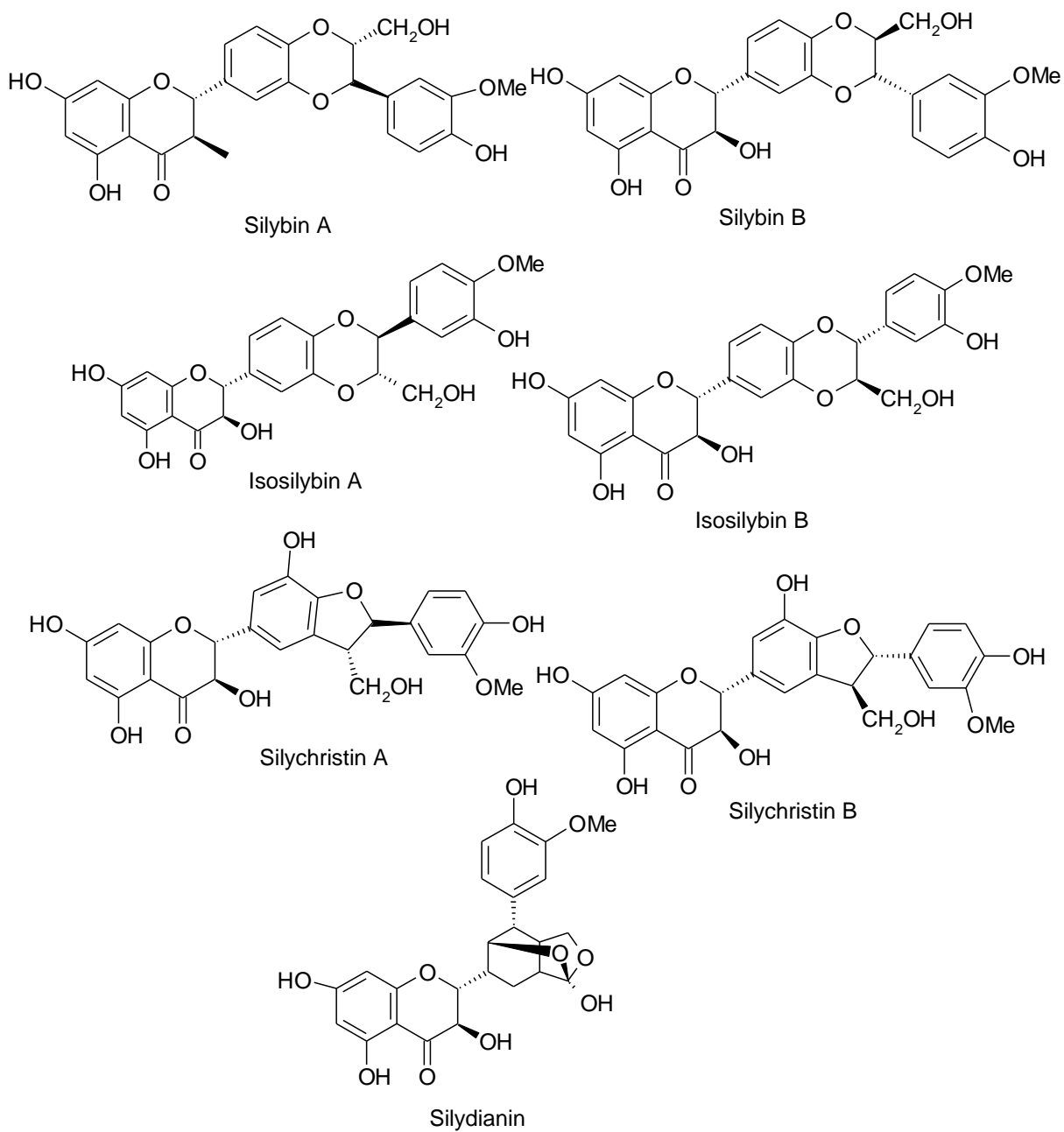
Viz Obrázek 2 *Chemická struktura silymarinového komplexu*

Obrázek 1 Biosyntéza silybinu



Zdroj: AbouZid S., Silymarin, natural flavonolignans from milk thistle (10), vytvořeno v programu MDL ISIS draw

Obrázek 2 Chemická struktura silymarinového komplexu



Zdroj: AbouZid S., Silymarin, natural flavonolignans from milk thistle (10), vytvořeno v programu MDL ISIS draw

### **3.1.6 Prokázané účinky ostropestřce mariánského**

#### **3.1.6.1 Hepatoprotektivní a choleretická aktivita**

Jak již bylo řečeno, ostropestřec mariánský je již po celá staletí používán na léčbu jaterních onemocnění a chorob žlučníku pro své choleretické (zvýšení tvorby žluči) a cholagogní (urychlení vylučování žluči) působení. Navíc působí mírně spazmolyticky. (6) Játra jsou klíčovým orgánem metabolismu a eliminace toxinů, není proto divu, že je pro tento účinek ostropestřec mariánský tolik ceněný. (13) V mnoha vědeckých studiích byla prokázána jeho hepatoprotektivní aktivita, je tedy s oblibou používán u postižení jater toxiny a u akutních, ale i chronických zánětlivých jaterních onemocnění. Tento hepatoprotektivní účinek silymarinu může být vysvětlen jeho antioxidační aktivitou na základě chemické struktury, jejíž základ tvoří fenol. (10) Silymarin zlepšuje hodnoty jaterních testů, příznivě ovlivňuje zejména hladinu alaninaminotransferázy v krvi. (4)

Mechanismus působení silymarinu na jaterní tkáň nebyl dosud plně prozkoumán, ale předpokládá se, že působí několika mechanismy najednou. (12)

Jedním z možných mechanismů účinku je jeho stabilizující vliv na membránu hepatocytů, čímž brání vstupu toxinů do buňky a jejich následnému škodlivému působení. Tím se vysvětluje např. účinek silymarinu při otravě jedovatými houbami a toxiny, ale i při virové hepatitidě, kdy tento membránu stabilizující vliv znemožňuje průnik viru do buňky. (12)

Dalším mechanismem je podpora regenerace jaterní tkáně tím, že zvyšuje aktivitu enzymů, konkrétně stimuluje jadernou polymerázu A a tím zvyšuje syntézu ribozomálních proteinů. (12) Tato schopnost byla prokázána zejména u silybinu a silychristinu.

Dalším známým mechanismem účinku je antioxidační působení spočívající ve vychytávání volných radikálů a ochraně hepatocytů před oxidačním stresem. (4)

#### **3.1.6.2 Protirakovinné účinky**

Protirakovinná a chemoprotektivní aktivita silymarinu je v posledních letech jedním z center zájmu vědeckých studií zabývajících se účinkem silymarinového komplexu. Silymarin se účastní regulace procesů apoptózy a ovlivňuje aktivitu regulátorů buněčného dělení, má tedy schopnost ovlivňovat nerovnováhu mezi procesy buněčné apoptózy a buněčným přežíváním. Tohoto účinku se dá využít při terapii určitých typů rakoviny. Efekt byl prokázán např. u rakoviny prostaty, přičemž nejvyšší aktivitu v této indikaci prokázal isosilybin B. (10; 13) Roli zde hraje také jeho antiandrogenní a antiestrogenní aktivita, na základě které může silymarin ovlivnit hormon dependentní nádory. Účinek byl dále pozorován u rakoviny močového měchýře a u rakoviny kůže. (5)

Nadějně využití by mohl mít silymarin také v kombinaci s chemoterapií, kde působí svou antioxidační aktivitou a chrání tak zdravé tkáně před cytostatiky, které způsobují oxidativní stres a působí hepatotoxicky. (5) V kombinaci s metotrexátem snižuje hodnoty jaterních testů a eliminuje tak nežádoucí účinky metotrexátu na jaterní tkáň (5), v kombinaci s cisplatinou zase snižuje její nefrotoxicitu (14). Silymarin může na základě své antioxidační aktivity působit také kardioprotektivně,

čehož se dá využít v kombinaci s doxorubicinem, jehož terapeutická aplikace je kvůli jeho kardiotoxicitě značně omezená. V kombinaci se silymarinem by však mohl být jeho negativní vliv na kardiocyty potlačen a tak by mohl být následně využíván jeho terapeutický potenciál. (5)

### **3.1.6.3 Protizánětlivá aktivita**

Silymarin působí protizánětlivě na základě několika mechanismů. Roli zde hraje jeho antioxidační aktivita, membrány stabilizující efekt a v neposlední řadě také jeho schopnost inhibovat produkci mediátorů zánětu, např. kyseliny arachidonové a jejích metabolitů, např. cestou inhibice 5 - lipoxygenázy. (10)

### **3.1.6.4 Použití v dermatologii a kosmetice**

Antioxidační aktivita silymarinu může být využita také po jeho topické aplikaci jako ochrana proti ultrafialovému záření A i B. Toto záření je silymarinem účinně eliminováno a chrání tak kůži před poškozením slunečním zářením a rakovinou kůže. Jeho efekt může být tedy využit jako ochrana před spálením pokožky slunečním zářením a jako prevence rakoviny kůže. Silymarin dokáže po jeho topické aplikaci eliminovat škodlivé účinky UV záření, jako je zčervenání a podráždění pokožky, ale i poškození DNA. (5)

Zevně se také ostropestřec může uplatnit v léčbě hemoroidů, křečových žil a bérceových vředů. (2)

### **3.1.6.5 Efekt na produkci prolaktinu**

Ostropestřec mariánský se tradičně používá u kojících matek ke zvýšení produkce mléka na základě stimulace hormonu prolaktinu. Po perorální aplikaci silymarinu se prokazatelně zvyšuje hladina prolaktinu v krvi a dochází ke stimulaci produkce mateřského mléka. Tento efekt přetrvává ještě 2 měsíce po ukončení užívání ostropestřce. (10)

### **3.1.6.6 Vliv na gastrointestinální trakt a diabetes**

Silymarin nepůsobí blahodárně pouze na činnost jater a žlučníku, ale také pankreatu tím, že dokáže urychlit obnovu jeho činnosti po intoxikacích. Pro své účinky na pankreas působí pozitivně i při *diabetes mellitus*, jelikož má schopnost zvyšovat produkci inzulínu a snižovat tak hladinu glukózy v krvi a chránit tělo před glukózovým stresem. Navíc dokáže silymarin také stimulovat aktivitu antioxidačních pankreatických enzymů - glutathionperoxidázy, superoxiddismutázy a katalázy. (5; 15)

Silymarin představuje novou naději v terapii diabetu nejen proto, že zvyšuje hladinu inzulínu, ale zároveň stimuluje regeneraci činnosti pankreatu. (5) Navíc byl studován jeho pozitivní efekt při léčbě diabetické nefropatie, u které dokáže snížit oxidativní stres a potlačit zánět. V kombinaci s inhibitory angiotenzin konvertujícího hormonu (ACEi) nebo sartany by tak mohl silymarin tvořit vhodnou léčbu diabetické nefropatie. (16)

### **3.1.6.7 Neuroprotektivní aktivita**

Silymarin by mohl být využíván jako prevence neurodegenerativních onemocnění, na základě jeho antioxidační aktivity, ale i dosud neznámých a ne

dostatečně prostudovaných mechanismů účinku. Silymarin prokázal efekt u nemocí jako je roztroušená skleróza, Parkinsonova a Alzheimerova choroba. (5) Bylo prokázáno, že dokáže omezit tvorbu  $\beta$ -amyloidu, jehož akumulace je typická pro Alzheimerovu chorobu. Silymarin má dále schopnost ovlivňovat typické změny v mozku, které se objevují při Parkinsonově chorobě, jako je snížení dopaminergní aktivity a ztráta dopaminergních neuronů v *substantia nigra*. Dokáže totiž zvyšovat hladinu dopaminu tím, že inhibuje monoaminoxidázu B. (17)

### 3.1.6.8 Ostatní

Aktivita silymarinu byla studována také u astmatu, kdy tato směs látek dokázala omezit bronchospasmus navozený bronchiální hyperreaktivitou vůči antigenům. Mechanismus tohoto účinku není dosud přesně prozkoumán, ale předpokládá se, že podstatou by mohlo být snížení alergenního působení histaminu. (10) Dále se tento pozitivní efekt na bronchiální hyperreaktivitu vysvětluje například jeho schopností inhibovat účinek kyseliny arachidonové a působit tak protizánětlivě nebo také jeho membránu stabilizujícím efektem. (5)

Dále byla prokázána jeho imunostimulační aktivita na základě antioxidačního působení. Dochází tak k proliferaci buněk imunitního systému. (10)

Pozitivní efekt byl také pozorován u obsedantně kompulsivní choroby, kdy se snížil počet těchto epizod, navíc bez vedlejších nežádoucích účinků, na rozdíl od běžně používaných antidepresiv. (10)

Byla prokázána jeho schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi a v souvislosti s tím i kardioprotektivní působení. (5) Konkrétně byla tato schopnost studována u silybinu na základě inhibice 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - koenzym A reduktázy (HMGR), klíčového enzymu v syntéze cholesterolu. Tento účinek nebyl prokázán pouze u silybinu, ale též u flavonoidu taxifolinu. (18)

Zajímavým objevem byla také schopnost silymarinu snižovat lékovou rezistenci, což je velký problém zejména u cytostatik a antibiotik. Tento efekt se vysvětluje schopností silymarinu interferovat s buněčnými transportéry, zodpovědnými za buněčnou rezistenci, jakými je např. P-glykoprotein. Silymarin je inhibitorem P-glykoproteinu a zabraňuje tak efluxu léčivé látky (LL) ven z buňky a snížení terapeutického účinku. (5) Tento efekt byl prokázán např. u chemoterapeutika daunomycinu, kdy se prokazatelně při jeho společné aplikaci se silymarinem zvýšila koncentrace uvnitř buňky. (19)

### 3.1.7 Indikace a použití silymarinu ve farmacii

Absorpce silymarinu po perorálním podání je cca 23-47 %, maximální terapeutická koncentrace je dosažena po 4-6ti hodinách a biologický poločas látky se pohybuje okolo šesti hodin. (17) Močí se vylučuje jen nepatrné procento, většina látky je z těla odstraněna ve formě konjugátu žlučí. (20)

Silymarin má tedy velmi nízkou biologickou dostupnost, danou špatnou rozpustností ve vodě. To značně limituje praktické použití samotného silymarinu. Přesto bylo vyvinuto již několik léčivých přípravků se silymarinem, jehož absorpce byla zvýšena farmaceutickými technologiemi a úpravami. Byla využita např. tvorba komplexů s látkami zvyšujícími jeho rozpustnost ve vodě a úprava velikosti

molekuly silymarinového komplexu frakcionací. Využívá se také technologie lipozomů a metod cílené distribuce do jaterní tkáně a podařilo se též vytvořit ve vodě rozpustnou sůl s megluminem - silibinin-meglumin. (21)

Průměrná denní dávka silymarinu při jaterním onemocnění se pohybuje kolem 420 mg/den. Terapie silymarinem je považována za velice bezpečnou s minimem nežádoucích účinků. U citlivých jedinců se však mohou objevit gastrointestinální obtíže nebo alergická reakce, vyrážka a bolesti hlavy. (5; 10) Je však podstatné, že po vysazení silymarinu nežádoucí účinky mizí. (20)

Nyní je na našem farmaceutickém trhu registrováno 5 léčivých přípravků s obsahem silymarinu. Jedná se o Flavobion<sup>®</sup>, Lagosu<sup>®</sup>, Legalon<sup>®</sup>, Silymarin AL<sup>®</sup> a Simepar<sup>®</sup>. Všechny tyto léčivé přípravky jsou volně prodejné, kromě Lagosy a Simeparu, jejichž výdej je vázán na lékařský předpis. Indikace těchto léčivých přípravků je obdobná - pomocná léčba chronické hepatitidy, jaterní cirhózy, toxického poškození jater a poškození jater alkoholem. (20)

Tablety se za účelem zvýšení absorpce silymarinu užívají po jídle. Terapie by měla být dlouhodobá a může trvat od 3 měsíců po 1 rok. (20)

## 3.2 Explantátové kultury

### 3.2.1 Z historie

Počátek výzkumu a využívání rostlinných explantátů se datuje ke konci 19. století, kdy Schleiden a Schwann přišli s objevem, že buňka je základním stavebním prvkem všech živých organizmů. Zastávaly názor, že buňka se jako samostatná autonomní jednotka dokáže sama regenerovat do podoby celé rostliny, pokud jí jsou poskytnuty vhodné podmínky pro růst. (22) Další vývoj pokračoval studiem růstu kalusů a jejich zkoumáním *in vitro*. Z vědců, kteří se tímto tématem zabývali, můžeme zmínit např. Trécula, Vöchtinga nebo Rechingera. (23)

První vědec, který úspěšně definoval základní podmínky kultivace explantátových kultur, byl německý vědec Gottlieb Haberlandt, který se v roce 1902 rozhodl kultivovat jednotlivé buňky izolované z listů. Buňky viditelně narostly, ale po měsíci kultivace začaly odumírat, protože kultivační médium neobsahovalo látky, které by stimulovaly buněčné dělení. I přes tento nevydařený konec je ale právem G. Haberlandt považován za otce kultur explantátových rostlin. (22; 23)

### 3.2.2 Definice

Pojmem explantátová kultura se rozumí taková rostlinná kultura, která je pěstována za stanovených umělých a aseptických podmínek v živném médiu, přičemž jsou k tomuto účelu používány jen izolované části rostliny, např. jednotlivé buňky, pletiva či orgány. (24) Jedná se tedy o produkci *in vitro* a získávají se tak klony mateřských rostlin. (22) Rostliny totiž mají vysokou regenerační schopnost a lze je tedy vypěstovat i za umělých podmínek ze somatických buněk, které obsahují

kompletní genetickou informací. Pro odvození explantátových kultur je tedy možné využít jakékoliv buňky z rostlinného organismu. (24; 25) Jak již bylo řečeno, podmínky růstu rostlinných explantátů jsou definované a kontrolované, upravuje se zásobení kultury živinami, pH média, okolní teplota, vlhkost a zásobení světlem. Ovlivňují se tedy podmínky, které jsou přirozené pro růst mateřské rostliny. (22; 24)

Podle diferencovanosti pletiva pak rozlišujeme explantátové kultury orgánové, tkáňové (kalusové) tvořené soudržným nediferencovaným pletivem, suspenzní tvořené volnými buněčnými shluky a buněčné. (26) Pro naši experimentální práci byly využívány kultury kalusové a suspenzní.

### **3.2.3 Typy rostlinných explantátů**

Rostlinné explantáty lze rozdělit podle jejich původu, charakteru pletiva a stupně organizovanosti na několik následujících typů. Toto rozdělení není zcela přesné, jelikož hranice mezi jednotlivými typy explantátů nejsou přesně vymezeny. Navíc jsou většinou tyto explantáty odvozovány jeden od druhého, tudíž spolu jejich původ úzce souvisí. (25; 26)

#### **3.2.3.1 Kultury buněčných protoplastů**

Jedná se o jednotlivé buňky zbavené buněčné stěny, které jsou obalené jen cytoplazmatickou membránou. (25; 26)

#### **3.2.3.2 Buněčné kultury**

Tyto kultury tvoří jednotlivé volné buňky. (26)

#### **3.2.3.3 Kalusové kultury**

Jde o zatím neorganizované shluky buněk, tvořící rostlinné pletivo. Přirozeně se kalusové pletivo tvoří na rostlinách po jejich poranění nebo napadení škůdci, proto se mu také říká pletivo hojivé. Kalusové kultury jsou v produkci *in vitro* jedny z nejpoužívanějších. Mohou se využívat k získávání klonů rostlin nebo po jejich rozmělnění k přípravě suspenzních kultur. (27)

Kalusové kultury většinou pocházejí z rostlinných pletiv složených z jednoho typu buněk. Vhodným zdrojem mohou být například pletiva získávaná z dřevě stonků mladých rostlin. Tato pletiva se přemístí do živného média a po zdvojnásobení až zčtyřnásobení svého objemu (po cca čtyřech týdnech) se tyto kalusy mohou přesadit do nových kultivačních médií. Tato procedura se může opakovat několikrát. (27)

Přídavkem cytokininů a snížením koncentrace auxinů v živném médiu lze vyvolat u kalusových kultur diferenciaci a tvorbu výhonků, které se posléze dají využít k regeneraci celé rostliny. (27)

### **3.2.3.4 Suspenzní kultury**

Suspenzní kultury se získávají z kalusů přemístěním do nového živného média a následným rozdrobněním. (22) Jedná se tedy o suspenze jednotlivých rostlinných buněk a malých buněčných shluků v tekutém médiu. Tyto suspenzní kultury se při kultivaci vždy umísťují na třepačku či roler. (27)

### **3.2.3.5 Orgánové kultury**

Jedná se již o kultivované rostlinné orgány, jako jsou kořeny, výhonky, listy a další rostlinné části. (25)

## **3.2.4 Technika a podmínky kultivace**

### **3.2.4.1 Laboratorní zařízení**

Pro kultivaci rostlin *in vitro* je zapotřebí dostatečné laboratorní vybavení. Zejména je to přístroj ke sterilizaci laboratorního skla a kultivačních médií (horkovzdušný sterilizátor, autokláv), dále box s laminárním prouděním vzduchu umožňující aseptickou práci s explantátovými kulturami a v neposlední řadě kultivační místnost zajišťující optimální kultivační podmínky. (24)

Jednotlivé suroviny pro přípravu kultivačních médií je třeba navažovat na analytických vahách zajišťujících dostatečnou přesnost. Box s laminárním prouděním je vybaven HEPA filtrem, který umožňuje filtraci vzduchu a zachycuje nečistoty o velikosti až 0,3  $\mu\text{m}$  s účinností až 99,9 %. Pro práci s malým množstvím rostlinných explantátů však stačí aseptický box vybavený germicidní zářivkou. Ke sterilizaci laboratorního skla se používá horkovzdušný sterilizátor, ve kterém teplota dosahuje až 140°C. K zajištění dlouhodobé sterility je zapotřebí vysterylizované pomůcky zabalit do hliníkové fólie. Dále se ke sterilizaci laboratorních pomůcek používá autokláv, mnohem častěji je ale využíván ke sterilizaci kultivačních médií. Principem je sterilizace horkou parou o teplotě 121°C za zvýšeného tlaku 100kPa. (24)

### **3.2.4.2 Podmínky kultivace**

Rostlinné explantáty jsou pěstovány *in vitro* v živném médiu za umělých podmínek. Tyto podmínky jsou dány zejména schopností regenerace buněk, tkání nebo orgánů, ze kterých kultury pocházejí. (22)

Velice důležité je zejména složení živného média, obsahující všechny podstatné živiny důležité pro růst mateřské rostliny. Jedná se zejména o makro- a mikroelementy, vitaminy a další organické sloučeniny. Nepostradatelný je také přírůstek rostlinných regulátorů a zdroj uhlíku jako základního stavebního prvku. Nejvíce používaným živným médiem je Murashige a Skoog médium (MS médium), které bylo používáno i pro tuto experimentální část. (22)

Jak již bylo řečeno, podstatnou roli hrají regulátory rostlinného růstu přidané do živného média. Volba typu a množství rostlinného regulátoru závisí zejména na druhu rostliny a na typu kultivovaných buněk či tkání. Nejvíce používanými růstovými regulátory jsou auxiny a cytokininy. Vyšší koncentrace auxinů vede

například k diferenciaci buněk v kořeny, pro diferenciaci buněk ve stonky a výhonky se používají naopak cytokininy. (22) Neznamená to však, že by ke kultivaci stačilo použití jen vysoké koncentrace jednoho z růstových regulátorů, záleží spíše na vzájemném poměru koncentrací použitých regulátorů a tvorba kultivačního média tak, aby obsah jednoho regulátoru optimálně převyšoval druhý. V jiném případě může dojít až k usmrcení explantátové kultury. (25)

Další důležitou podmínkou kultivace je pH živného média, které by mělo být mírně kyselé, většinou v rozmezí 5,4-5,8. Toto pH pak ovlivňuje růst rostlinné kultury i aktivitu růstových regulátorů. (22) Růst explantátových kultur ovlivňuje také světelný režim, tedy délka a intenzita osvětlení. Dále je důležité dodržovat správnou teplotu v kultivační místnosti, kde jsou explantátové kultury uchovávány a kultivovány. (23)

Nezbytným předpokladem pro kultivaci *in vitro* je také dodržování aseptických podmínek, jelikož jen minimální množství zanesených bakterií do živného média se dokáže velice rychle reprodukovat, zejména díky zdroji sacharidů v živném médiu, a zahubit tak narůstající rostlinnou kulturu. Pracuje se tedy v prostředí laminárního boxu, který tyto aseptické podmínky zajišťuje. (25)

### 3.2.5 Růstové regulátory rostlin

Fytohormony jsou rostlinné hormony regulující růst a vývoj rostlin. Od živočišných hormonů se liší menší mírou specializace, a tudíž se jeden fytohormon účastní více buněčných pochodů. Podobností ale je, že se vyskytují v nepatrných množstvích, ale i tato minimální koncentrace stačí k jejich vysoké biologické aktivitě. Podobný je i mechanismus účinku, kdy je důležitá interakce rostlinného hormonu s cílovým receptorem, který se nachází buď v jádře a následně zvyšuje nebo snižuje expresi genů nebo v cytoplazmě, kdy následkem interakce dochází k uvolnění vápenatých iontů a následně k aktivaci nebo inhibici určitých enzymů. Regulace rostlinného růstu je tedy podmíněna kaskádou biochemických reakcí. (28)

Pro regulaci růstu explantátových kultur není podstatný jen výběr druhu růstového regulátoru, ale také jejich správná kombinace a vzájemný obsahový poměr. (23)

#### 3.2.5.1 Auxiny

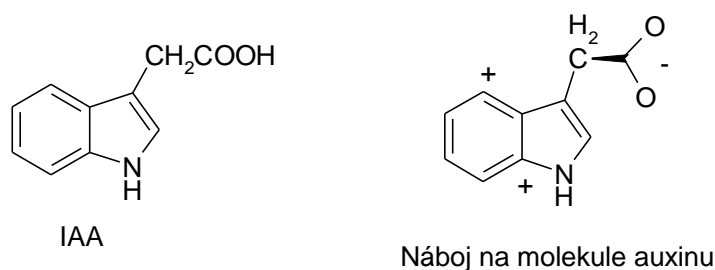
Auxiny jsou nejdéle známou a tudíž i nejprostudovanější skupinou rostlinných hormonů. V současnosti je známo mnoho druhů auxinů, ať již přírodních nebo chemicky syntetizovaných derivátů. Jedná se tedy o velmi různorodou skupinu fytohormonů. Nejčastěji se v přírodě vyskytujícím druhem auxinu je kyselina indolyl-3-octová (IAA). Co se týče syntetických auxinů, mezi nejčastěji využívané patří např. kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 2, 4 - dichlorfenoxycetová (2,4-D) a kyselina  $\alpha$ -naftylacetová ( $\alpha$ -NAO). (28; 29)

Podstatou mechanismu účinku auxinů je jejich záporný náboj na postranním řetězci (viz Obrázek 3 *Kyselina indolyl-3-octová*). V rostlině je nalezneme ve všech

nadzemních rostlinných orgánech, zejména v rychle rostoucích, jako jsou pupeny nebo nové výhonky. Auxiny tedy v rostlině regulují růst rostlinných orgánů do délky (tzv. „dlouhivý růst“), přičemž velice záleží na koncentraci těchto hormonů. Určitá koncentrace je optimální pro růst pupenů nebo stonků, jiná zase pro vývoj kořenových výhonků. V příliš vysoké koncentraci dochází naopak k inhibici růstu všech rostlinných orgánů. Další účinky auxinů zahrnují podporu zrání plodů, diferenciaci vodivých pletiv a stimulaci růstu buněk a tedy i kalusů. (28)

Jejich praktické využití je například v podpoře zakořeňování a množení rostlin, k urychlení dozrání plodů a při kultivaci *in vitro* k podpoře růstu kalusů (23; 28; 29). V kultivačních médiích bývají auxiny nejčastěji využívány společně s cytokininy, kdy podporují diferenciaci a organogenezi. (23)

**Obrázek 3 Kyselina indolyl-3-octová**



*Zdroj: Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J. Fyziologie rostlin. Regulace růstu (28), vytvořeno v programu MDL ISIS draw*

### 3.2.5.2 Cytokininy

Další skupinou přirozeně se vyskytujících rostlinných růstových hormonů jsou cytokininy. Chemicky se jedná o deriváty adeninu. Jedním z nejdéle známých a nejvýznamnějších zástupců této skupiny je zeatin (6,4-hydroxy-3-methyl-*trans*-2-butenylaminopurin), další přírodní prakticky využívaný cytokinin je např. 2iP (6 - dimethylaminopurin). Podařilo se připravit i cytokininy syntetické, přičemž nejvýznamnější a nejvíce používanou látkou je BAP (6 - benzylaminopurin). (28; 29)

Na rozdíl od giberelinů, jejichž zdrojem jsou nadzemní, mladé části rostlin, místem tvorby cytokininů jsou naopak rostlinné kořeny, přesněji kořenové vrcholky. Příležitostně se cytokininy mohou tvořit i v pupenech a hromadit se v semenech, kde působí lokálně. (28; 29)

Hlavním účinkem cytokininů je podpora buněčného cyklu a dělení buněk a urychlení organogeneze. Dále potlačují stárnutí listů i celé rostliny tím, že zabraňují předčasnému zániku chloroplastů a zamezují rozkladu bílkovin. Cytokininy jsou také velice důležité při produkci rostlinných kultur *in vitro*, kde společně s auxiny ovlivňují růst těchto kultur a buněčnou regeneraci. Převažující podíl cytokininů nad auxiny stimuluje tvorbu pupenů a naopak inhibuje růst kořenů. (28; 29)

Cytokiny jsou tedy prakticky nejvíce využívány při kultivacích rostlinných explantátů, kde se přidávají do kultivačních médií a podporují zde regeneraci a růst rostlinných buněk, tvorbu rostlinných výhonků a zároveň potlačují vývoj kořenů. (28; 29) Nejčastěji bývají využívány společně s auxiny. (23)

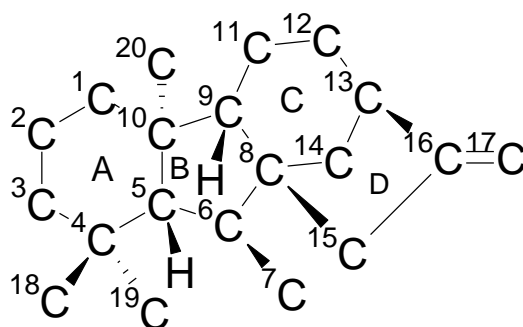
### 3.2.5.3 Gibereliny

V současné době je známo již přes sto zástupců této skupiny růstových hormonů, přičemž nejstarší známou látkou je kyselina giberelová (GA<sub>3</sub>). Ostatní gibereliny dostaly názvy podle pořadí, v jakém byly objevovány. Mezi nejvýznamnější gibereliny patří GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>. Všechny gibereliny mají povahu kyselin, přičemž nosičem účinku je tetracyklický *ent*-giberelanový skelet a karboxylové skupiny ležící v poloze 7 a 19 (viz Obrázek 4 *Struktura ent-giberelanového skeletu*). (28; 29)

Gibereliny se tvoří v mladých a rychle rostoucích částech rostlin, např. v pupenech, semenech a listech. Posléze ovlivňují růst stonků a výhonků do délky a prodlužovací růst všech nadzemních částí rostlin, přičemž růst kořenů bývá většinou potlačen. Na stoncích pak vyvolávají a urychlují kvetení, u semen podporují jejich klíčení. (28; 29)

Gibereliny se mohou využívat k dozrání plodů a k urychlení přechodu rostliny do reprodukční fáze. Naopak byly vyvinuty inhibitory giberelinů, které se využívají k potlačení růstu do délky a nechtěnému prodlužování rostliny, např. v okrasném zahradnictví. Jejich přidavek do kultivačního média podporuje dělení buněk a prodlužování nových výhonků. (28; 29) Co se týče organogeneze, tu gibereliny většinou potlačují. (23)

Obrázek 4 *Struktura ent-giberelanového skeletu*



Struktura *ent*-giberelanového skeletu, složeného z kruhu A, B, C, D

Zdroj: Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J. *Fyziologie rostlin. Regulace růstu* (28), vytvořeno v programu MDL ISIS draw

### 3.2.5.4 Kyselina abscisová (ABA)

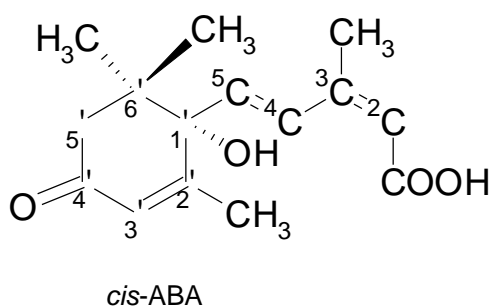
Tento růstový regulátor je významný pro rostlinu zejména v nepříznivých podmínkách a ve zvýšené míře se vytváří v období stresu. Je tedy důležitý pro odolnost rostliny. ABA obsahuje chirální centrum na uhlíku číslo jedna, může se tedy

nacházet ve dvou enantiomerních formách, přičemž biologicky aktivní je *cis*-izomer (viz Obrázek 5 *cis*-ABA). (28)

ABA se v rostlině tvoří v kořenových vrcholcích a ve všech nadzemních částech ovlivněných nedostatkem vody, kde zabraňuje její ztrátě průduchy. Zvýšená koncentrace ABA má tedy vliv na uzavírání průduchů a následné snížení transpirace rostliny vede k ochraně před jejím vysušením. Dále má tato kyselina schopnost chránit rostlinu proti nepříznivým vlivům prostředí (např. nadměrnému suchu, přehnojení půdy a mrazu) na základě zvyšování odolnosti cytoplazmatické membrány a tudíž chrání buňky před těmito škodlivými účinky. (28)

Co se týče ovlivnění rostlinného růstu, vlivem této kyseliny dochází ke zvýšené tvorbě kořenového vlásnění při potlačení růstu nadzemních rostlinných orgánů. Dále se uplatňuje při dozrávání semen, kdy je chrání před nežádoucími ztrátami vody a následnou dehydratací. Neméně důležitým účinkem ABA je podpora dormance rostliny, konkrétně pupenů a semen, v zimním období tím, že zvyšuje syntézu etylénu v rostlině a podporuje tak opad listů a květů. (28) Její přídavek do živného média je důležitý pro podporu somatické embryogeneze. (23)

Obrázek 5 *cis*-ABA



Zdroj: Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J. *Fyziologie rostlin. Regulace růstu* (28), vytvořeno v programu MDL ISIS draw

### 3.2.5.5 Etylen

Tento plynný uhlovodík je také přirozeným produktem rostlin. Je vytvářen téměř ve všech rostlinných orgánech, zejména v těch rychle rostoucích, ale největší množství se syntetizuje v plodech při jejich dozrávání. Je biosyntetizován z aminokyseliny methioninu, přičemž ke zvýšené produkci dochází stejně jako u kyseliny abscisové v období stresu pro rostlinu. (28)

Typickými účinky etylenu je tzv. „trojí reakce: inhibice prodlužovacího růstu, stimulace radiálního růstu a porucha gravitropické reakce“, podporuje tedy zmožňování stonku. Ovlivňuje také stárnutí rostliny a opad listů, květů a plodů. (28)

### 3.2.5.6 Polyaminy

Tyto fytohormony mají vliv zejména v období rychlého rostlinného růstu, podporují klíčení a dělení buněk. (28) Účinek polyaminů velmi úzce souvisí

s účinkem etylenu. Polyaminy ovlivňují hladinu etylenu v rostlinném organizmu, předpokládá se tedy částečně společný mechanismu účinku. (23)

### **3.2.5.7 Kyselina jasmonová**

Tato látka má poněkud odlišné vlastnosti než ostatní fytohormony, potlačuje totiž růst rostliny a její klíčení. Podobně jako kyselina abscisová a etylen se v rostlině syntetizuje v období stresu a produkce se také zvyšuje se stárnutím rostliny. (28)

### **3.2.5.8 Brassinosteroidy**

Jak již název napovídá, jedná se o látky steroidní povahy. Tyto fytohormony podporují množení buněk, prodlužování stonku a růst rostliny. (23; 28) V produkci *in vitro* jsou zatím jejich účinky jen zkoumány a nemají dosud praktické využití. (23)

## **3.2.6 Kultivační média**

Velice důležitou podmínkou růstu explantátových kultur je jejich dostatečné zásobení živinami, které narůstající rostlinná kultura čerpá z živného média. (29) Dále je kultivační médium zdrojem nepostradatelných růstových hormonů. (23) Složení média tedy přímo ovlivňuje růst explantátových kultur. Navíc je toto složení úzce specifické pro různé typy rostlinných kultur podle jejich původu. Musí se brát tedy zřetel nejen na druh mateřské rostliny, ale i na rostlinný orgán, z kterého kultura pochází. (29)

Obecně jsou kultivační média složena z makroelementů, mikroelementů, vitaminů, aminokyselin, zdroje uhlíku a dusíku, růstových regulátorů a dalších organických sloučenin, zejména cukrů jako zdroje energie. Součástí kultivačního média o koncentraci vyšší než 0,5 mmol/l jsou považovány za makroelementy a složky o koncentraci pod touto hodnotou za mikroelementy. (23; 29)

Mezi základní typy kultivačních médií, které se v současnosti nejvíce používají, patří MS médium, Linsmaier a Skoog médium (LS médium), Gamborg médium (B5 médium) a dále např. Nitsch a Nitsch médium (NN médium). (29)

### **3.2.6.1 Složení kultivačního média**

#### Makroelementy

Všechny rostlinné organizmy jsou složeny ze základních chemických prvků, jako je uhlík, kyslík a vodík a dalších makroelementů, např. dusíku, draslíku, fosforu, hořčíku, síry a vápníku.

Rostlina potřebuje pro svůj správný vývoj jako zdroj alespoň 25-60 mmol/l anorganického dusíku. Draslík je podstatný pro správný buněčný růst a je rostlinou vyžadován v koncentraci 20 až 30 mmol/l. Ve většině živných médií je obsažen ve formě dusičnanů nebo chloridů. Nejvhodnější koncentrace zbylých makroelementů, jako je fosfor, hořčík, síra a vápník je v rozmezí 1-3 mmol/l. (29)

### Mikroelementy

Mezi základní mikroelementy důležité pro rostlinný růst a vývoj patří bor (v koncentraci 25-100  $\mu\text{mol/l}$ ), mangan (20-90  $\mu\text{mol/l}$ ), měď (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ), molybden (1  $\mu\text{mol/l}$ ), zinek (5-30  $\mu\text{mol/l}$ ) a železo (1  $\mu\text{mol/l}$ ), přičemž nejpodstatnější z mikroelementů pro vývoj rostliny je pravděpodobně železo. Železo se v živných médiích navzdory jejich špatné rozpustnosti vyskytuje většinou ve formě solí jako citrát nebo tartarát. Špatná rozpustnost těchto solí může být řešena tvorbou chelátu s etylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA). Dalšími prvky, které se mohou přidávat k podpoře růstu explantátových kultur do specifických kultivačních médií, jsou jód, chlór, kobalt a sodík. (29)

### Zdroj uhlíku

Jako zdroj uhlíku a zároveň energie se v kultivačních médiích hojně využívá sacharóza (v koncentraci 2-5 %) nebo další sacharidy, jako je glukóza, laktóza, galaktóza, maltóza. (29)

### Vitaminy

Vitaminy mají podstatnou roli v katalýze rostlinných enzymatických procesů a jsou důležité pro buněčný růst. Pro kultivaci *in vitro* je v živných médiích nejvíce využíván thiamin (vitamin B1), pyridoxin (vitamin B6) a kyselina nikotinová (vitamin B3). Thiamin je esenciální pro růst všech rostlinných buněk a používá se v koncentracích 0,1-10 mg/l. Ačkoli pyridoxin a kyselina nikotinová nejsou pro buněčný růst esenciální, často se do kultivačních médií přidávají, a to v koncentracích 0,1-10 mg/l pyridoxinu a 0,1-5 mg/l kyseliny nikotinové. (29)

V živných médiích se mohou využívat i další vitaminy, jako je např. biotin, kyselina listová, kyselina pantothenová, kyselina askorbová (vitamin C) a tokoferol (vitamin E). (29)

### Myo-inositol

Tento sacharid je přidáván v nízkých koncentracích 50-5000 mg/l do většiny kultivačních médií k podpoře buněčného růstu. V buňce se rozkládá na kyselinu askorbovou a pektiny a zabudovává se do fosfatidylinositolů a fosfoinositidů a je tak podstatný pro buněčné dělení. (29)

### Aminokyseliny

Aminokyseliny představují pro rostlinu velice důležitý zdroj dusíku, a ačkoliv si je většina rostlin schopná tyto látky syntetizovat sama, jejich přídavek do kultivačního média ovlivňuje příznivě růst rostlinných explantátů. Ke kultivaci se používá např. hydrolyzát kaseinu (v koncentracích 0,25-1 g/l), L-glutaminu (8 mmol/l), L-asparaginu (100 mg/l) a adeninu. (29)

### Ostatní organické sloučeniny

Přídavek některých přírodních látek může také pozitivně ovlivnit růst explantátových kultur. Jedná se např. o kokosové mléko a kvasničný nebo sladový extrakt. (29)

### Solidifikační přísady

Ke zpevnění kultivačních médií se může využívat např. agar, agaróza nebo guma gellan. Nejčastěji používanou přísadou k přípravě polotuhých a tuhých médií

je agar, a to v koncentracích 0,8-1 %. Jeho výhodou je, že se za zvýšené teploty (v rozmezí 60-100°C) dobře rozpouští ve vodě a za běžné laboratorní teploty tuhne. (29)

#### Růstové regulátory

Viz kapitola 3.2.5 *Růstové regulátory rostlin*

#### **3.2.6.2 Příprava kultivačního média**

Správnost přípravy živného média je velmi důležitým krokem při kultivaci rostlinných explantátů, jelikož přímo ovlivňuje růst těchto kultur. Špatná příprava kultivačního média je častou příčinou jejich nesprávného růstu. (29)

Principem přípravy kultivačních roztoků je ředění koncentrovaných zásobních roztoků v čas potřeby. Tyto zásobní roztoky se uchovávají v lednici při teplotě 2-4°C. Důležitým krokem přípravy kultivačního média je sterilizace, čímž se zabrání jeho bakteriální kontaminaci. Ke sterilizaci se běžně využívá autokláv a teploty okolo 115 – 135°C. Pro sterilizaci kultivačních médií s termolabilními složkami se může využít bakteriální filtrace přes mikrofiltr s velikostí pórů 0,22- 0,45 μm. (29)

#### **3.2.7 Využití explantátových kultur**

Explantátové kultury rostlin jsou široce využívány pro účely výzkumu, ale i například v botanice, kde se používají ke šlechtění rostlin (26) nebo se využívají k rychlému získání klonů ohrožených druhů rostlin, a v neposlední řadě i ve farmacii, kde se u těchto explantátových kultur metodou elicitace zvyšuje produkce sekundárních metabolitů. Metoda pěstování explantátových kultur rostlin je velice efektivní, jelikož se z malé části rostliny dokáží v kontinuálním procesu získat tisíce explantátů. Další výhodou je její rychlost a možnost produkce po celý rok, bez ohledu na roční období, počasí a úrodnost půdy, jelikož podmínky růstu jsou neustále uměle udržovány. (22)

### **3.3 Elicitace**

Produkce léčivých rostlin a zejména izolace jejich sekundárních metabolitů k léčebným účelům je značně finančně i časově náročná a často ne moc produktivní. Organická syntéza rostlinných sekundárních metabolitů není mnohdy možná, jelikož se často jedná o složité mnohastupňové biosyntetické reakce, což by bylo pro účely využití v medicíně a farmacii finančně neúnosné. Proto se hledají metody, které by izolaci LL usnadnily a urychlily a tím i ekonomicky zvýhodnily. (30) Jednou z možností je využití explantátových kultur rostlin. Kultivace *in vitro* je jednodušší a rychlejší než pěstování celých léčivých rostlin a navíc je možno snadno sledovat a ovlivňovat produkci jejich sekundárních metabolitů. Tato produkce je však bohužel velmi nízká a mnohdy ještě menší, než produkce LL matečnými rostlinami. (30)

Při kultivaci *in vitro* je samozřejmě požadováno, aby produkce žádoucích LL byla co nejvyšší. Jednou z metod, jak zvyšovat produkci sekundárních metabolitů rostlinnými explantátovými kulturami, je elicitace, kdy se využívá vlivu tzv. elicitorů (stresorů). (30) Růst rostlin a tedy i produkce sekundárních metabolitů totiž úzce

souvisí s okolními podmínkami, jako je např. světlo, zásobení živinami a teplota. Reakcí rostliny na tyto stresové podmínky je kaskáda metabolických reakcí, do kterých jsou zapojeny některé chemické látky, tzv. signální molekuly, jako např. ABA, kyselina jasmonová a salicylová, polyaminy, vápenaté ionty a oxidy dusíku. Je známo, že tyto signální molekuly mohou působit po jejich exogenní aplikaci jako elicitory. Můžeme tedy pomocí těchto látek regulovat produkci sekundárních metabolitů u rostlinných explantátových kultur. (31) Těto metody se pro produkci sekundárních metabolitů s oblibou využívá zejména pro její jednoduchost, ekonomičnost a nenáročnost na prostory. (11)

Při metodě elicitace se sleduje vliv různých druhů elicatorů o různých koncentracích přidávaných do kultivačního média na produkci sekundárních metabolitů. Podstatou této metody je najít správný elicator o ideální koncentraci pro konkrétní druh rostliny, poněvadž explantátové kultury různých léčivých rostlin reagují na různé elicitory odlišně. Dále je nutné sledovat dobu působení elicatoru, po kterou produkce LL dále stoupá a určit délku působení, po které je produkce těchto LL nejvyšší. (11; 30)

### 3.3.1 Elicitory

Elicitory jsou látky, které mají schopnost vyvolat u rostlinných explantátových kultur hypersenzitivní reakci a zvyšovat genovou expresi, čímž se zvýší i produkce sekundárních metabolitů. (30) Elicitory lze rozdělit podle původu na biotické a abiotické. (32)

#### 3.3.1.1 Biotické elicitory

Biotické elicitory, jak již název napovídá, jsou přírodního původu. Do této skupiny lze zařadit polysacharidy, proteiny a konidie pocházející z hub a jiných patogenních organismů. Některé tyto elicitory jsou specifické pro produkci konkrétních sekundárních metabolitů, jako např. sloučenina pocházející z houby *Armillaria mellea* (václavka obecná) zvyšuje produkci alkaloidů, patogenní houba *Verticillium dahliae* podporuje produkci fenolických sloučenin a *Botrytis sp.* zvyšuje produkci terpenoidů. Oligosacharidy se využívají pro získávání saponinů a kvasničný extrakt pro akumulaci flavonoidů. (30)

Pro produkci sekundárních metabolitů explantátové kultury *Silybum marianum* byl prakticky využíván např. kvasničný extrakt, cyklodextrin (7; 33), chitin, chitosan, (33) a koniferylalkohol, jako prekurzor flavonolignanů. (3)

Biotické elicitory jsou často využívány zvláště pro jejich nízkou cenu, minimální nežádoucí účinky a vysokou efektivnost působení na zvyšování produkce sekundárních metabolitů. (30)

#### 3.3.1.2 Abiotické elicitory

Abiotické stresové faktory se obecně rozdělují na fyzikální a chemické. (32) Mezi fyzikální elicitory lze zařadit např. UV záření, extrémní horko nebo mráz a přebytek světla (31; 32), chemické elicitory představují např. těžké kovy a jiné toxické sloučeniny, jako např. pesticidy, přebytek iontů v kultivačním médiu, a tím vyvolaný osmotický stres nebo naopak nedostatek živin, vody a kyslíku. (30; 31; 32) Mezi abiotické elicitory lze také zařadit již zmiňovanou kyselinu jasmonovou,

salicylovou a abscisovou, dále vápenaté ionty, polyaminy a různé růstové regulátory. (31)

Z abiotických elicitorů se pro produkci sekundárních metabolitů *Silybum marianum in vitro* již využívaly např. methyljasmonát (7; 34), stříbrné ionty (33) a v neposlední řadě pyridinové deriváty, jako např. paraquat (methylviologen) (11) a deriváty pyrazinu a pyrazin-2-karboxylové kyseliny (12; 35).

#### Deriváty pyrazinu jako elicitory

Pyrazinové deriváty jako látky přírodního původu hrají roli zejména jako atraktanty, feromony a signální molekuly. Jsou produkovány také některými druhy plísní, kdy mají antibakteriální a protiplísňový účinek. Prakticky se deriváty pyrazinu využívají např. v tabákovém průmyslu a s oblibou se přidávají také do parfémů. (36)

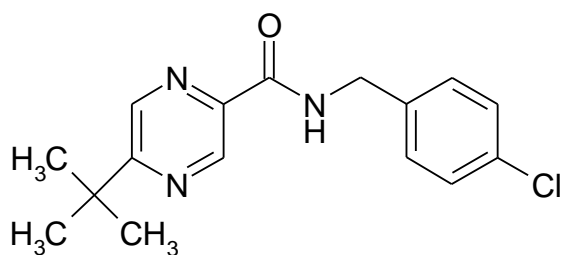
Syntetické deriváty pyrazinu jsou pak mnohé důležité LL. Jsou to především chemoterapeutika a antituberkulotika. Příkladem může být pyrazinamid (amid kyseliny pyrazin – 2 - karboxylové), používaný k léčbě mykobakteriálních infekcí. Perspektivně se k použití jeví také chlorované pyrazinové deriváty. Deriváty pyrazin-2-karboxamidu jsou zkoumány pro svůj antimykobakteriální účinek, některé látky působí také herbicidně a antibakteriálně. Většina těchto látek inhibuje u rostlin produkci kyslíku při fotosyntéze. (36; 37)

Role pyrazinových derivátů jako elicitorů rostlinných explantátových kultur se začala intenzivně studovat v 70. letech minulého století. Deriváty pyrazin-2-karboxamidu byly již testovány jako elicitory explantátových kultur *Silybum marianum* k produkci flavonolignanů a flavonoidů anebo kultur *Ononis arvensis*. (36; 38) Schopnost zvyšovat produkci flavonolignanů *in vitro* u rostliny *Silybum marianum* byla prokázána již u těchto pyrazinových derivátů:

- *N*-(3-iodo-4-methylphenyl)pyrazin-2-karboxamid, (12)
- *N*-(3-iodo-4-methylphenyl)-5-*terc*-butyl-pyrazin-2-karboxamid, (12)
- 5-*terc*-butyl-*N*-*m*-tolylpyrazin-2-karboxamid, (35)
- *N*-(5-bromo-2-hydroxyphenyl)-5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxamid, (35)
- 5-(2-hydroxybenzoyl)-pyrazin-2-karboxamid. (38)

V této diplomové práci byl jako elicitor použit 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid (viz Obrázek 6), který byl nově syntetizován na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty HK.

Obrázek 6 5-*tert*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid



Vytvořeno v programu MDL ISIS draw

Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnost: 303,79

Rozpustnost: etanol, DMSO (dimethylsulfoxid)

### 3.3.2 Mechanismus působení elicitorů

Elicitory vyvolávají v rostlině řetězec obranných reakcí označovaných jako stresová reakce, kterou lze rozdělit do několika fází. (32)

První fáze je tzv. *poplachová*, ke které dochází ihned po prvotním kontaktu elicitoru s rostlinou. Elicitor ovlivňuje buněčné rostlinné struktury a pokud míra jeho působení nepřekročí letální mez, rostlina dále přežívá a jsou vyvolány další obranné reakce. Začíná tak druhá fáze stresové reakce, tzv. *restituční*. Podstatou je aktivace určitých metabolických pochodů v buňce. Rostlina se tak postupně stává odolnější vůči působení elicitoru a přechází do fáze *rezistence*. Pokud by však bylo působení elicitoru nepřetržité a příliš dlouhé, rostlina by se začala postupně vlivem neustálých stresových faktorů oslabovat a vyčerpávat. Poslední fáze stresové reakce je tedy nazývána fáze *vyčerpání*. (32)

Každá rostlina má různý způsob, jak se se stresovým působením rozličných elicitorů vyrovnává, přičemž záleží i na délce jejich působení. Elicitor může vyvolávat, jak již bylo řečeno, zvýšenou produkci určitých sekundárních metabolitů. Působení elicitoru však může vést i ke klíčení rostliny nebo tvorbě plodů. Mechanismus působení elicitorů není tedy zcela jednotný, naopak se jedná spíše o velkou rozmanitost, která je daná jak druhem elicitoru, tak druhem rostliny, na kterou působí. Stresová reakce je totiž významně ovlivněna rostlinnou genetickou výbavou, která podmiňuje odolnost rostliny vůči stresu. (32)

Společným znakem většiny stresových reakcí jsou však metabolické děje. Přes značnou rozmanitost lze tedy nalézt i některé podobnosti v adaptaci rostlin na stresové faktory. Jedná se zejména o tvorbu a odstraňování kyslíkových radikálů, tvorbu proteinů, stresových fytohormonů a osmoregulačních látek (např. cukrů). (32)

### 3.3.2.1 *Stresové proteiny*

Většina rostlin rychle reaguje na působení stresových okolních faktorů syntézou proteinů, které se za normálních okolností v rostlině nevyskytují (tzv. stresové proteiny). Tvorba ostatních proteinů, které rostlina běžně syntetizuje, může být naopak potlačena. Nejintenzivnější produkce těchto stresových proteinů bývá několik hodin po začátku vystavení rostliny elicitoru. (32)

Syntéza některých typů stresových proteinů je vyvolána působením některých stresových faktorů obdobně. Mluvíme tak o stresových proteinech *nespecifických* a jde např. o molekulární chaperony, proteázy a ubikvitin. Jedná se tedy převážně o proteiny, které se běžně v rostlině vyskytují, avšak za stresových podmínek se jejich obsah v rostlině mnohonásobně zvyšuje. (32)

Produkce určitých stresových proteinů je naopak úzce spojena s působením konkrétních stresových faktorů, jedná se tedy o stresové proteiny *specifické*. Příkladem mohou být proteiny indukované zvýšenou teplotou – HSP (Heat Shock Proteins) a proteiny indukované chladem (cold-induced proteins). Tyto proteiny mají často schopnost chránit enzymy před denaturací. Dalšími příklady mohou být proteiny indukované dehydratací (dehydration-induced proteins), které se syntetizují např. při zasolení půdy nebo proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku – ASP (Anaerobic Stress Proteins) a proteiny indukované patogeny – PRP (Pathogenesis-Related Proteins), tvořící velkou a značně nejednotnou skupinu stresových proteinů. Některé tyto proteiny mají specifické antivirové, antibakteriální a protiplísňové účinky. (32)

### 3.3.2.2 *Aktivní formy kyslíku*

Rostliny často reagují na stresové podmínky také tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů. Přeměňují tedy nereaktivní atmosférický kyslík na velice reaktivní kyslíkovou formu. Hlavní nebezpečí pro rostlinu tkví v peroxidaci lipidů, zejména těch membránových. Tyto nebezpečné vedlejší produkty mohou mít ale i pozitivní úlohu jako signály při určitých stresových situacích, kdy jsou zapojeny do některých obranných reakcí. Přiměřená tvorba kyslíkových radikálů může mít také ochrannou funkci na rostlinu svou protimikrobní účinností. K tvorbě těchto radikálů dochází především v chloroplastech a mitochondriích. (32)

## 4 PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1 Rostlinný materiál

K vypracování diplomové práce byla použita kalusová a suspenzní kultura z pasáže 64-69 rostliny *Silybum marianum*, (L.) Gaertn.

### 4.2 Použité pomůcky a chemikálie

#### 4.2.1 Pomůcky

Analytické váhy Sartorius PRLT A13, Německo

Autokláv PS 20, Chirana, ČR

Box s laminárním prouděním vzduchu Fatran LF, Výrobní družstvo Pokrok, Slovensko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

Filtrační papír

Horkovzdušný sterilizátor Chirana SVS9/1, ČR

HPLC Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko Kolona LiChrospher RP-18 250-4, sorbent Li Chrospher 5 $\mu$ m

Laboratorní sklo

Mikrofiltry (0,45  $\mu$ m), Tessek, ČR

Pipetovací balónek, Filip, Německo

Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5  $\mu$ m

Pumpa Jasco PU-2089 Plus, Japonsko

Sušárna HS 61A Chirana, ČR

Těsnění na vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc, ČR

Třepačka UNIMAX 2010, Heidolph Instruments, Německo

Vialky, Labicom s.r.o. Olomouc, ČR

Vodní lázeň, typ 1042, GFL, Německo

#### 4.2.2 Chemikálie

Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný p. s., Lachema, ČR

Dusičnan amonný, p. a., Penta, ČR

Dusičnan draselný p. a., Lach-Ner, ČR

Etanol 96%, Lachema, ČR

Glycin, Aldrich, USA  
Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovensko  
Chlorid kobaltnatý p. a., (CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), Lachema, ČR  
Chlorid vápenatý p. a., Penta, ČR  
Jodid draselný p. a., Lachema, ČR  
Kyselina boritá p. a., Lachema, ČR  
Kyselina nikotinová, Lachema, ČR  
Kyselina *o*-fosforečná, Lachema, ČR  
Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová, Sigma, USA  
Metanol p. a., Lachema, ČR  
Molybdenan sodný, Lachema, ČR  
Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko  
Pyridoxin puriss, Koch-Light Laboratories, Velká Británie  
Sacharóza čistá, Lachema, ČR  
Síran hořečnatý p. a., Lachema, ČR  
Síran manganatý p. a., Lachema, ČR  
Síran měďnatý p. a., Lachema, ČR  
Síran zinečnatý (ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), Lachema, ČR  
Síran železnatý čistý (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), Lachema, ČR  
Superčistá voda, Katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR  
Thiamin, Koch-Light Laboratories, Velká Británie  
5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid

### 4.3 Příprava pomůcek ke kultivaci

V průběhu experimentu bylo používáno laboratorní sklo značky SIAL, které je odolné vůči vysokým teplotám a chemikáliím. Rostlinný materiál byl kultivován v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml. V případě kultivace kalusových kultur byly do těchto baněk pomocí pinzety vloženy můstky vytvořené z filtračního papíru. Po nalití cca 30 ml živného média a překrytí hliníkovou fólií byly takto připravené baňky sterilizovány v autoklávu 15 minut při 121°C a 100 kPa. Pro pasážování byl použit box s laminárním prouděním vzduchu předem očištěný roztokem lihu a vysterilizovaný germicidní zářivkou.

#### 4.4 Příprava živného média

Živné médium slouží jako minerální výživa a zdroj energie pro rostoucí explantátovou kulturu rostliny. Pro kulturu *Silybum marianum* se používalo MS médium s přídatkem 1ml (10 mg/ml) růstového stimulantu  $\alpha$ -NAO.

Pro přípravu živného média se do odměrné baňky o objemu 1000 ml odměřuje:

- 100 ml mikroelementů,
- 10 ml železnatého komplexu,
- 1 ml mikroelementů,
- 1 ml glycinu,
- 1 ml vitaminů,
- 1 ml růstového stimulantu  $\alpha$ -NAO.

Vše se promíchá a zředí destilovanou vodou na cca 500 ml.

Poté se na analytických vahách odváží:

- 30,0 g sacharózy,
- 0,100 g myo-inositolu,
- 1,000 g hydrolyzátu kaseinu.

Vše se přidá do odměrné baňky a míchá se do rozpuštění jednotlivých složek. Poté se doplní objem destilovanou vodou do 1000 ml po rysku.

#### Přesné složení MS média (mg/l)

##### Makroelementy:

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

##### Mikroelementy:

Na <sub>2</sub> EDTA	37,340
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,840
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	11,500
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200

KI	0,830
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025

Vitaminy a organické sloučeniny:

Hydrolyzát kaseinu	1000,000
Myo-inositol	100,000
Sacharóza	30,000
Glycin	2,000
Kyselina nikotinová	0,500
Pyridoxin hydrochlorid	0,500
Thiamin hydrochlorid	0,100

#### 4.5 Pasážování

K pasážování se používaly kalusové kultury rostliny *Silybum marianum* z předchozí kultivace (tzv. inokulum). Samotné pasážování probíhalo v boxech s laminárním prouděním vzduchu za sterilních podmínek. Narostlé části kalusové kultury se pomocí sterilních pinzet přenesly do předem připravených 100 ml Erlenmeyerových baněk s čerstvým živným médiem. Kalusy se vkládaly do baněk s papírovými můstky z filtračního papíru. Suspenzní kultury se připravily mechanickým rozmělněním kalusu pinzetou o stěny baňky přímo v živném médiu bez papírových můstek. Na závěr se baňky opět zakryly hliníkovou fólií. Suspenzní kultury se umístily na třepačku (s rychlostí 120 otáček za minutu), která zajišťuje provzdušňování živného média.

Kalusové kultury byly kultivovány po dobu 25 dnů. Suspenzní kultury se ponechaly kultivovat po dobu 17 dnů. Těmto kulturám se zajišťovaly takové podmínky, které jsou přirozené pro rostlinu, ze které pocházejí – světelná perioda zahrnující 8 hodin tmy a 16 hodin světla a stálá teplota 25°C.

#### 4.6 Příprava roztoku elicitoru

Jako elicitor se používal 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid. Navážka této látky činila 50 mg.

Používaly se 3 roztoky tohoto elicitoru o různých koncentracích:

C<sub>1</sub> = 50mg/50ml (3, 292.10<sup>-3</sup> mol/l)

C<sub>2</sub> = 5mg/50ml (3, 292.10<sup>-4</sup> mol/l)

$$C_3 = 0,5\text{mg}/50\text{ml} \quad (3, 292 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$$

Roztok o koncentraci  $C_1$  se připravil navážením 50 mg elicitoru a jeho rozpuštěním v 50 ml etanolu 96%. Další koncentrace se získaly zředováním koncentrovanějšího roztoku a to následujícím způsobem. Odpipetovalo se 5 ml roztoku o koncentraci  $C_1$  do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplnilo po rysku etanolem 96%. Získala se tak druhá potřebná koncentrace  $C_2$ . Poté se 5 ml roztoku o koncentraci  $C_2$  převedlo do další odměrné baňky o objemu 50 ml, který se opět doplnil etanolem 96% po rysku a získal se tak roztok o nejnižší koncentraci  $C_3$ .

Stejně jako v případě pasážování se i při přípravě roztoků elicitoru pracovalo za sterilních podmínek v prostředí laminárního boxu a používalo se sterilní laboratorní sklo.

#### 4.7 Elicitace

K elicitaci se používaly 3 různé koncentrace roztoku elicitoru, přičemž vliv každé této koncentrace se zkoumal zvlášť na suspenzních a kalusových kulturách.

Připravilo se cca 30 baněk s narostlými kulturami a každá baňka se označila dobou plánovaného odběru vzorku - 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Pro každou dobu odběru se použilo cca 3-4 baněk. Do cca šesti baněk se roztok elicitoru nepřidával a jejich obsah se poté použil jako kontrolní vzorek.

Samotná elicítace se prováděla za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Použity byly kalusové kultury kultivované po dobu 25 dnů a suspenzní kultury kultivované po dobu 17 dnů. Do každé baňky se odpipetoval 1 ml roztoku elicitoru, u suspenzních kultur přímo do živného média, u kalusových kultur na papírový můstek. Během pokusu se používaly sterilní laboratorní pomůcky.

Poté se baňky vrátily zpět do kultivační místnosti a suspenzní kultury na třepačku. Po určitých časových intervalech (6, 12, 24, 72 a 168 hodin) se kultivace ukončovala. Kalusové kultury a přefiltrované suspenzní kultury se ponechaly při laboratorní teplotě uschnout na filtračním papíře. Část živného média se odebrala a uschovala v mrazáku pro následnou analýzu. Vysušené kalusové a suspenzní kultury se následně použily ke stanovení obsahu flavonolignanů a taxifolinu. Současně se po 24 a 168 hodinách odebíraly kontrolní vzorky bez přídavku elicitoru.

#### 4.8 Příprava extraktů pro stanovení obsahu

Vysušené vzorky kalusových a suspenzních kultur se v třecí misce rozdrobnily na prášek, který se poté zvážil na analytických vahách (viz Tabulka 1). Rozdrobněné kultury se extrahovaly dvakrát 10 ml metanolu 80% na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Oba extrakty se spojily v odměrné baňce o objemu 25 ml a doplnily metanolem 80% po rysku. Rozmražené roztoky živných médií

z jednotlivých dob kultivace se odpařily na vodní lázni do sucha. Tyto odparky se poté rozpustily v 10 ml metanolu 80%.

Takto připravené extrakty se následně zfiltrují přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 µm a cca 1,7 ml roztoku se převedlo do vialek. Tyto roztoky se poté analyzovaly metodou HPLC.

**Tabulka 1 Navážky jednotlivých suspenzních a kalusových kultur [g]**

Doba odběru [hod.]	Kalus C <sub>1</sub>	Kalus C <sub>2</sub>	Kalus C <sub>3</sub>	Suspenze C <sub>1</sub>	Suspenze C <sub>2</sub>	Suspenze C <sub>3</sub>
6	0,1719	0,1585	0,3114	0,1422	0,1911	0,0625
12	0,1163	0,1937	0,3047	0,0962	0,1142	0,0431
24	0,0914	0,2234	0,2111	0,0841	0,1878	0,0826
<b>Kontrola 24</b>	0,1481	0,1135	0,1911	0,0282	0,0763	0,1233
48	0,1374	0,2534	0,1962	0,0909	0,0819	0,0539
72	0,1357	0,1824	0,3157	0,1622	0,1965	0,0540
168	0,0988	0,1980	0,2489	0,1443	0,0935	0,0899
<b>Kontrola 168</b>	0,1303	0,0755	0,1784	0,1016	0,1112	0,0473

Pozn. C<sub>1</sub> = 3, 292.10<sup>-3</sup> mol/l; C<sub>2</sub> = 3, 292.10<sup>-4</sup> mol/l; C<sub>3</sub> = 3, 292.10<sup>-5</sup> mol/l

## 4.9 Stanovení obsahu pomocí HPLC

### 4.9.1 Obecná charakteristika HPLC

Obsah flavonolignanů a taxifolinu v kalusových a suspenzních kulturách byl stanoven metodou HPLC. Jedná se o chromatografickou separační metodu, využitelnou pro stanovení obsahu, čistoty i ke zkouškám totožnosti. Pro stanovení obsahu se sleduje výška (plocha) jednotlivých píků. (39; 40)

### 4.9.2 Parametry HPLC analýzy

Chromatograf: analýza jednotlivých vzorků kultury *Silybum marianum* byla prováděna na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 µm) s ochrannou předkolumnou.

Mobilní fáze: eluent A – voda (superčistá) s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné; eluent B – metanol (gradient grade) s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné.

Eluce: eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově z 0 % metanolu a 100 % vody v čase t = 0 minut do 50 % metanolu a 50 % vody v čase t = 5 minut. Poté probíhala eluce izokraticky z 50 % metanolu a 50 % vody do času t = 25 minut. Mobilní fáze obsahovala jako pufr vždy 0,15 % kyseliny fosforečné.

Detekce: detekce jednotlivých složek vzorků byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 – 550 nm.

Stanovení obsahu: obsah sledovaných látek byl stanoven výpočtem z ploch píků při vlnové délce 288 nm. Obsah všech látek byl stanoven metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Objem nástřiku: 50  $\mu$ l

Průtok: 1,4 ml/min

Teplota kolony: 25°C

Standardy: Silymarin

#### 4.9.3 Kalibrační křivky

##### 1. *taxifolin*

x: koncentrace (mg/g)

y: plocha

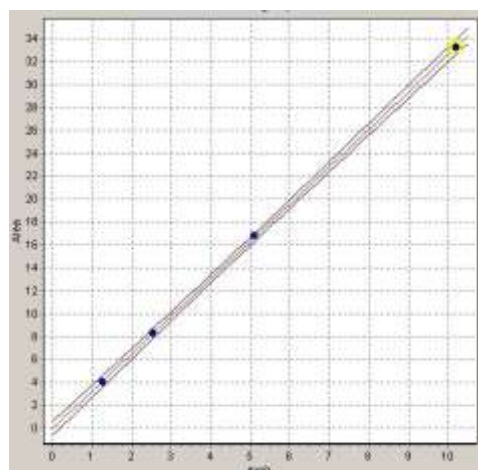
y:  $bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26361

Obrázek 7 Kalibrační křivka taxifolinu



##### 2. *silychristin*

x: koncentrace (mg/g)

y: plocha

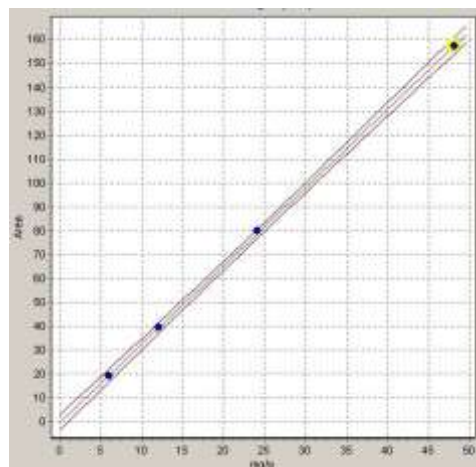
y =  $bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26964

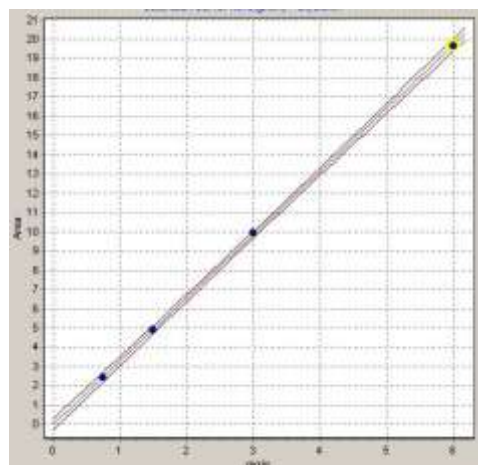
Obrázek 8 Kalibrační křivka silychristinu



### 3. silydianin

x: koncentrace (mg/g)  
y: plocha  
 $y = bx + a$   
regresní koeficient: 0,9999  
 $a = 0$   
 $b = 3,28186$

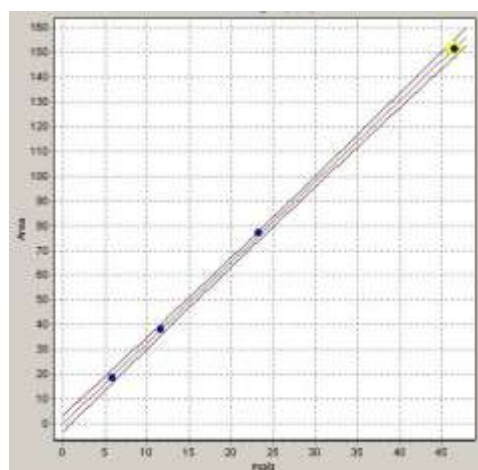
Obrázek 9 Kalibrační křivka silydianinu



### 4. silybin A

x: koncentrace (mg/g)  
y: plocha  
 $y = bx + a$   
regresní koeficient: 0,9999  
 $a = 0$   
 $b = 3,26609$

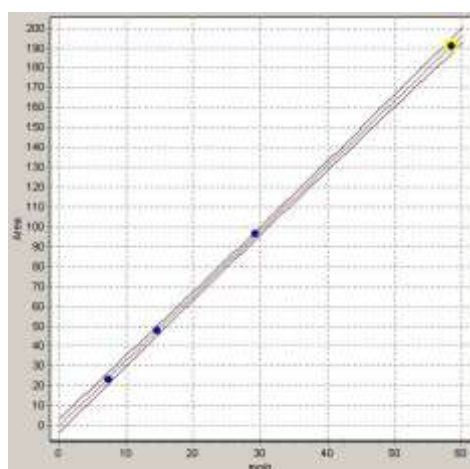
Obrázek 10 Kalibrační křivka silybinu A



### 5. silybin B

x: koncentrace (mg/g)  
y: plocha  
 $y = bx + a$   
regresní koeficient: 0,9999  
 $a = 0$   
 $b = 3,26957$

Obrázek 11 Kalibrační křivka silybinu B



## 6. isosilybin A

x: koncentrace (mg/g)

y: plocha

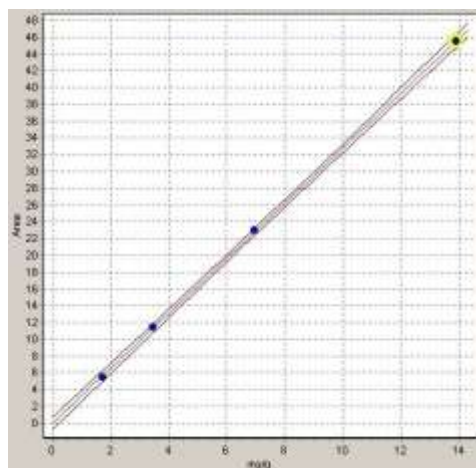
$$y = bx + a$$

regresní koeficient: 0,9999

$$a = 0$$

$$b = 3,27665$$

Obrázek 12 Kalibrační křivka isosilybinu A



## 7. isosilybin B

x: koncentrace (mg/g)

y: plocha

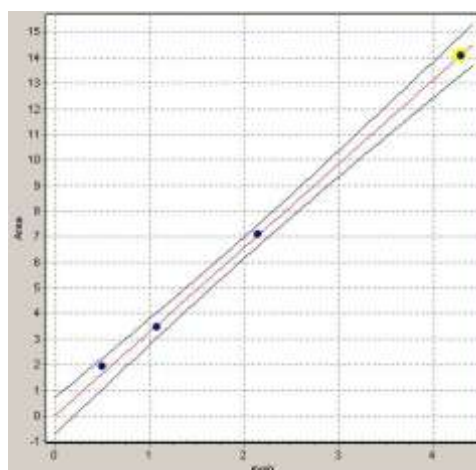
$$y = bx + a$$

regresní koeficient: 0,9992

$$a = 0$$

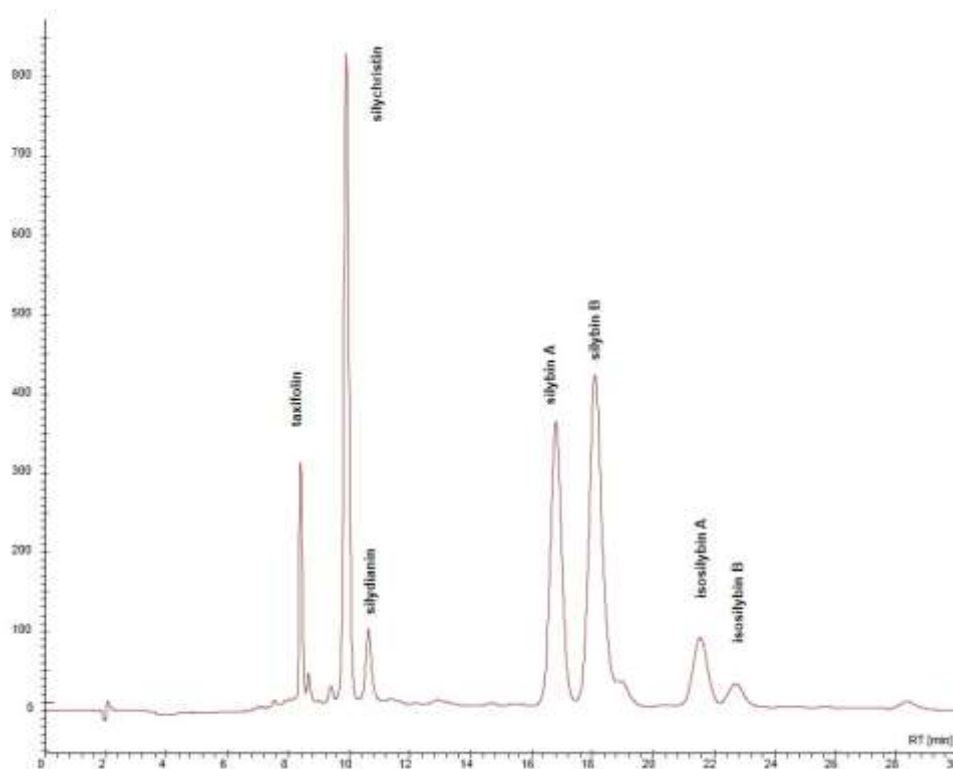
$$b = 3,28158$$

Obrázek 13 Kalibrační křivka isosilybinu B



#### 4.9.4 HPLC chromatogram standardu silymarinu

Obrázek 14 HPLC chromatogram standardu silymarinu



#### 4.10 Statistické zpracování výsledků

Ke statistickému zpracování výsledků byly použity hodnoty směrodatné odchylky a nepárového t-testu.

Směrodatná odchylka je veličina, která vyjadřuje, jak se hodnoty liší od průměrné (střední) hodnoty.

Funkce směrodatné odchylky je definována vztahem:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

s – směrodatná odchylka

$y_i$  – hodnota sledované veličiny

$\bar{y}$  – průměrná hodnota sledované veličiny

n – počet členů souboru

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonolignanů byl použit nepárový t-test rozdílu dvou průměrů.

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočítaném podle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou kritickou hodnotou  $t(v, p)$  pro vypočtený stupeň volnosti  $v$  a zvolenou hladinu významnosti  $p$ . Je-li hodnota  $t$  větší než hodnota  $t(v, p)$ , je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti  $p$ . (41)

Byla provedena vždy tři paralelní stanovení, proto počet členů souboru je  $n_1 = n_2 = n_3$ , počet stupňů volnosti  $v = 4$ . Pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$  a pro 4 stupně volnosti je tato kritická hodnota testovacího kritéria ( $t(v, p)$ ) rovna 2,78. Výsledky jsou statisticky významné, je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota. (42; 41)

Pro výpočet hodnot testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24 a 48 hodinách byla použita kontrolní hodnota odběru po 24 hodinách působení elicitoru, pro odběry 72 a 168 hodin kontrolní hodnota po 168 hodinách elicitace. K výpočtu intervalových odhadů středních hodnot a nepárového t-testu byl použit program TtestNMiS.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru

Tabulka 2 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Taxifolin [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silychristin [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silydianin [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silybin A [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silybin B [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Isosilybin A [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Isosilybin B [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silymarinový komplex [mg.g <sup>-1</sup> DW]
C <sub>1</sub> = 3, 292.10 <sup>-3</sup>	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	<b>0,079</b>	0	0	0	0	0	<b>0,079</b>
	24K	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0,364	0	0	0	0	0	0	0
	72	0,221	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>2</sub> = 3, 292.10 <sup>-4</sup>	6	1,419	<b>0,142</b>	0	0	0	0	0	<b>0,142</b>
	12	0	<b>0,129</b>	0	0	0	0	0	<b>0,129</b>
	24	1,761	<b>0,280</b>	0	0	0	0	0	<b>0,280</b>
	24K	0,064	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	<b>0,099</b>	0	0	0	0	0	<b>0,099</b>
	72	0,466	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0,061	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub> = 3, 292.10 <sup>-5</sup>	6	0	0	<b>0,064</b>	0	0	0	0	<b>0,064</b>
	12	0,353	0	<b>0,140</b>	0	<b>0,131</b>	0	0	<b>0,271</b>
	24	0,154	<b>0,130</b>	0	0	0	0	0	<b>0,130</b>
	24K	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0,115	0	0	0	0	0	0	0
	72	0,325	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	<b>0,110</b>	0	0	<b>0,110</b>
	168K	0	0	0	0	0	0	0	0

Pozn. 24K, 168K = kontrolní vzorek; 0 = naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno

## 5.2 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru

Tabulka 3 Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Taxifolin [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silychristin [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silydianin [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silybin A [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silybin B [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Isosilybin A [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Isosilybin B [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Silymarinový komplex [mg.g <sup>-1</sup> DW]
C <sub>1</sub> = 3,292.10 <sup>-3</sup>	6	0,334	<b>0,194</b>	0	0	0	0	0	<b>0,194</b>
	12	1,014	0	<b>0,234</b>	0	0	0	0	<b>0,234</b>
	24	0,208	0	0	0	0	0	0	0
	24K	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0,523	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>2</sub> = 3,292.10 <sup>-4</sup>	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	5,910	<b>0,958</b>	0	0	0	0	0	<b>0,958</b>
	24K	0,050	0	0	0	0	0	0	0
	48	5,189	<b>1,618</b>	<b>0,253</b>	0	0	0	0	<b>1,871</b>
	72	1,903	0	0	0	0	0	0	0
	168	0,588	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0,049	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub> = 3,292.10 <sup>-5</sup>	6	0,200	0	0	0	0	0	0	0
	12	2,088	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	24K	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0,148	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0	0

Pozn. 24K, 168K = kontrolní vzorek; 0 = naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno

### 5.3 Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru a statistické zpracování výsledků

Tabulka 4 Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře a statistické zpracování výsledků

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Silymarinový komplex [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů
C <sub>1</sub> = 3, 292.10 <sup>-3</sup>	6	0	-
	12	0	-
	24	0,079 ± 0,004	+
	24K	0	-
	48	0	-
	72	0	-
	168	0	-
	168K	0	-
C <sub>2</sub> = 3, 292.10 <sup>-4</sup>	6	0,142 ± 0,008	+
	12	0,129 ± 0,007	+
	24	0,280 ± 0,014	+
	24K	0	-
	48	0,099 ± 0,005	+
	72	0	-
	168	0	-
	168K	0	-
C <sub>3</sub> = 3, 292.10 <sup>-5</sup>	6	0,064 ± 0,004	+
	12	0,271 ± 0,014	+
	24	0,130 ± 0,007	+
	24K	0	-
	48	0	-
	72	0	-
	168	0,110 ± 0,006	+
	168K	0	-

Pozn. 24K, 168K = kontrolní vzorek; 0 = naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno; + = došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů dle nepárového t-testu provedeného v programu TtestNMIŠ; intervalový odhad pro hodnotu 0,280 mg. g<sup>-1</sup> DW po 24 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub>, kdy byla produkce flavonolignanů nejvyšší, se pohybuje na hladině významnosti 0,05 v rozmezí 0,248 < μ<sub>B</sub> - μ<sub>A</sub> < 0,311.

## 5.4 Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru a statistické zpracování výsledků

Tabulka 5 Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře a statistické zpracování výsledků

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Silymarinový komplex [mg.g <sup>-1</sup> DW]	Statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů
C <sub>1</sub> = 3, 292.10 <sup>-3</sup>	6	0,194 ± 0,010	+
	12	0,234 ± 0,012	+
	24	0	-
	24K	0	-
	48	0	-
	72	0	-
	168	0	-
	168K	0	-
C <sub>2</sub> = 3, 292.10 <sup>-4</sup>	6	0	-
	12	0	-
	24	0,958 ± 0,048	+
	24K	0	-
	48	1,871 ± 0,094	+
	72	0	-
	168	0	-
	168K	0	-
C <sub>3</sub> = 3, 292.10 <sup>-5</sup>	6	0	-
	12	0	-
	24	0	-
	24K	0	-
	48	0	-
	72	0	-
	168	0	-
	168K	0	-

Pozn. 24K, 168K = kontrolní vzorek; 0 = naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno; + = došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů dle nepárového t-testu provedeného v programu TtestNMIŠ; intervalový odhad pro hodnotu 1,871 mg. g<sup>-1</sup> DW po 48 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub>, kdy byla produkce flavonolignanů nejvyšší, se pohybuje na hladině významnosti 0,05 v rozmezí 1,657 < μ<sub>B</sub> - μ<sub>A</sub> < 2,084.

## 5.5 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu kalusových kultur *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru

Tabulka 6 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu kalusových kultur

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Taxifolin [mg/100ml]	Silychristin [mg/100ml]	Silydianin [mg/100ml]	Silybin A [mg/100ml]	Silybin B [mg/100ml]	Isosilybin A [mg/100ml]	Isosilybin B [mg/100ml]
C <sub>1</sub> = 3, 292.10 <sup>-3</sup>	6	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	<b>0,220</b>	0	0	0	0
	24	0	0	0	<b>0,380</b>	0	0	0
	24K	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>2</sub> = 3, 292.10 <sup>-4</sup>	6	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
	24K	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	<b>0,790</b>	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub> = 3, 292.10 <sup>-5</sup>	6	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
	24K	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0

Pozn. 24K, 168K = kontrolní vzorek; 0 = naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno

## 5.6 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu suspenzních kultur *Silybum marianum* při použití třech různých koncentrací elicitoru

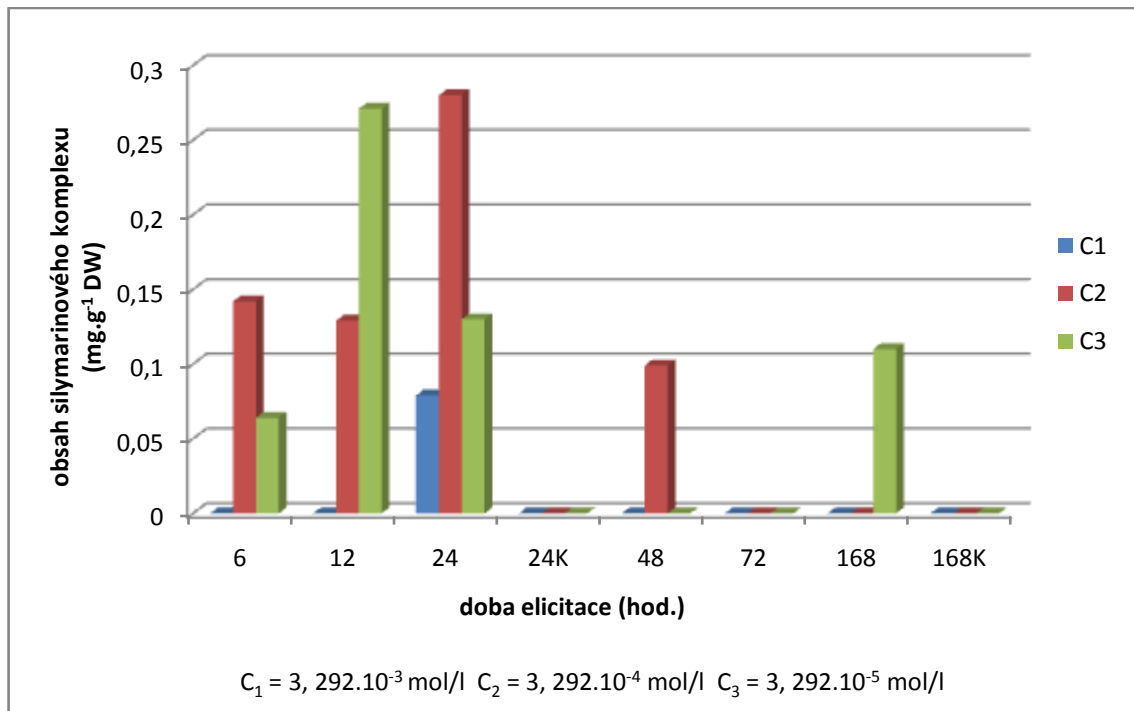
Tabulka 7 Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu suspenzních kultur

Koncentrace elicitoru [mol/l]	Doba elicitace [hod.]	Taxifolin [mg/100ml]	Silychristin [mg/100ml]	Silydianin [mg/100ml]	Silybin A [mg/100ml]	Silybin B [mg/100ml]	Isosilybin A [mg/100ml]	Isosilybin B [mg/100ml]
C <sub>1</sub> = 3, 292.10 <sup>-3</sup>	6	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
	24K	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>2</sub> = 3, 292.10 <sup>-4</sup>	6	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
	24K	0	0	0	0	0	0	0
	48	0,380	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
	168	0,240	0	0	0	0	0	0
	168K	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub> = 3, 292.10 <sup>-5</sup>	6	0,290	0	0	0	0	0	0
	12	0,240	<b>1,920</b>	<b>0,710</b>	<b>0,190</b>	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
	24K	0	<b>0,290</b>	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0
	168K	0	<b>0,280</b>	0	0	0	0	0

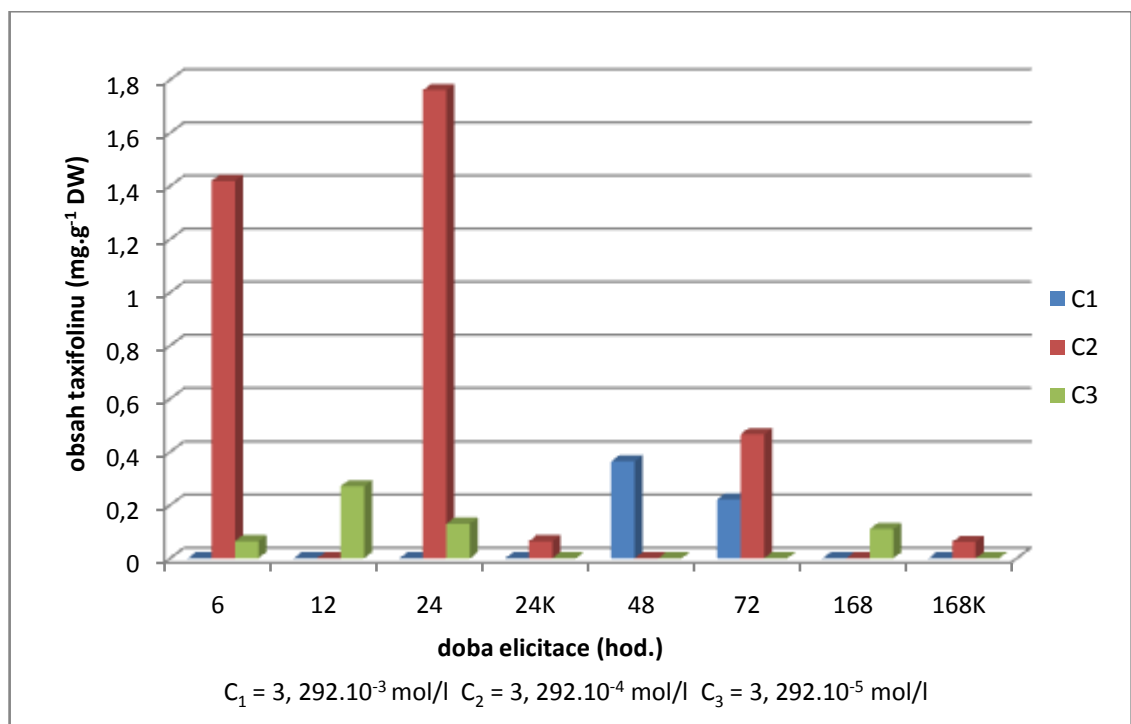
Pozn. 24K, 168K = kontrolní vzorek; 0 = naměřená stopová množství nebo nebylo detekováno

## 5.7 Grafické vyjádření obsahu silymarinového komplexu a taxifolinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru

Graf 1 Obsah silymarinového komplexu [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ ] v kalusové kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru

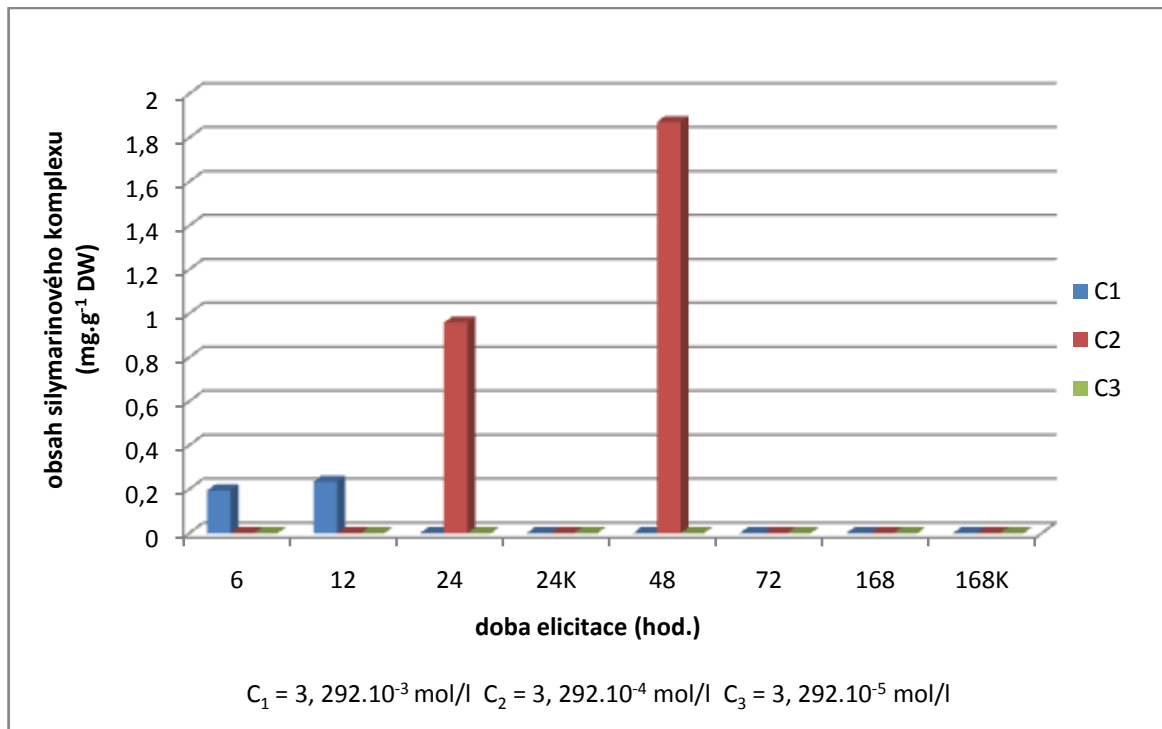


Graf 2 Obsah taxifolinu [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ ] v kalusové kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru

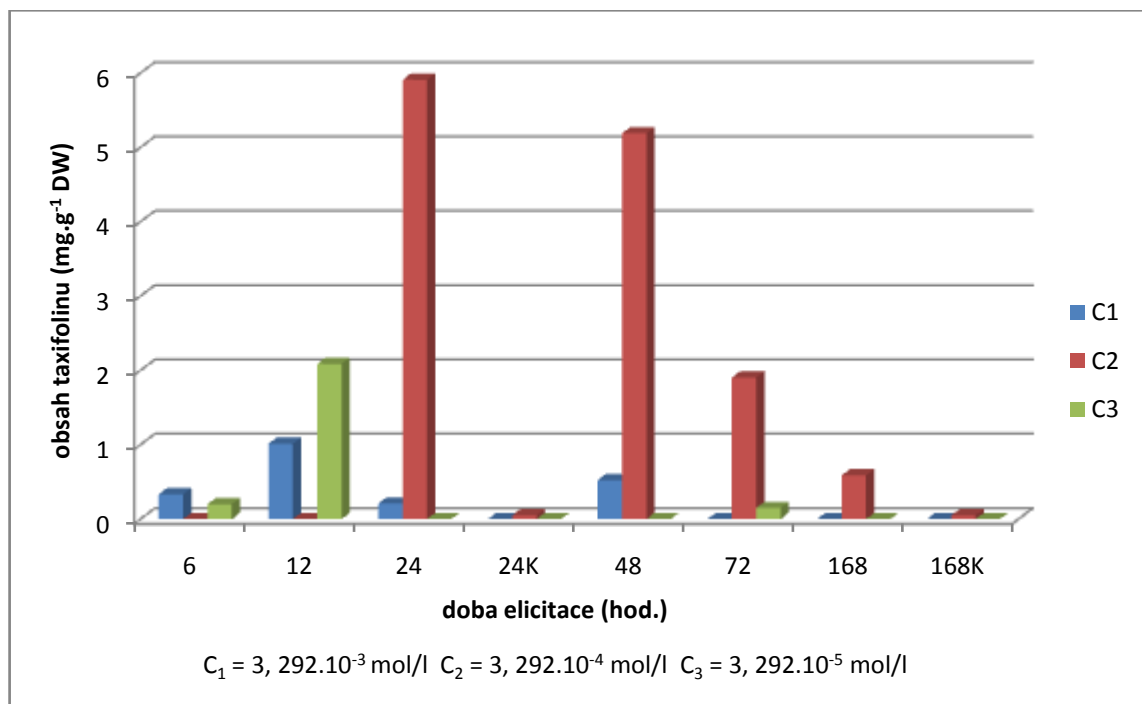


## 5.8 Grafické vyjádření obsahu silymarinového komplexu a taxifolinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru

Graf 3 Obsah silymarinového komplexu [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ ] v suspenzní kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru



Graf 4 Obsah taxifolinu [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ ] v suspenzní kultuře *Silybum marianum* po působení různých koncentrací elicitoru



## 6 DISKUZE

Cílem této práce bylo seznámit se s technikou kultivace rostlinných explantátových kultur a dále zjistit vliv abiotického elicitoru derivátu pyrazin-2-karboxamidu na produkci flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum*. Jako kultivační médium bylo použito MS médium s přídatkem 10 mg/ml  $\alpha$ -NAO.

Jako elicitor byl použit 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid ve třech různých koncentracích:

$$C_1 = 50\text{mg}/50\text{ml} \quad (3, 292 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l})$$

$$C_2 = 5\text{mg}/50\text{ml} \quad (3, 292 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l})$$

$$C_3 = 0,5\text{mg}/50\text{ml} \quad (3, 292 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$$

Vliv tohoto elicitoru byl zkoumán po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách jeho působení a porovnán s kontrolními vzorky odebíranými po 24 a 168 hodinách elicítace.

### Kalusová kultura

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů došlo po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $C_1$ , dále po 6, 12, 24 a 48 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $C_2$  a po 6, 12, 24 a 168 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $C_3$  (viz Tabulka 2, Graf 1).

Největší nárůst obsahu flavonolignanů (0,280 mg.g<sup>-1</sup> DW) byl zjištěn po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $C_2$ , kdy došlo k více jak dvojnásobnému zvýšení obsahu v porovnání s obsahem po 12 hodinách elicítace (0,129 mg.g<sup>-1</sup> DW). Druhý nejvyšší nárůst obsahu flavonolignanů (0,271 mg.g<sup>-1</sup> DW) nastal po 12 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $C_3$  a třetí po 6 hodinách působení roztoku o koncentraci  $C_2$  (0,142 mg.g<sup>-1</sup> DW). Nejvýhodnější se tedy z hlediska obsahu flavonolignanů jeví použitý elicitor v koncentraci  $C_2$  a doba elicítace 24 hodin. Při elicítaci touto koncentrací elicitoru docházelo také k nejrovnoměrnejším nárůstům obsahu flavonolignanů (viz Graf 1).

Při použití elicitoru v koncentraci  $C_1$  byl jediný nárůst obsahu silychristinu pozorován po 24 hodinách jeho působení (0,079 mg.g<sup>-1</sup> DW), v ostatních dobách elicítace byly detekovány nulové hodnoty a nedocházelo ani ke zvyšování obsahu ostatních složek silymarinového komplexu. Bylo pozorováno také uvolňování flavonolignanů do živného média. Po 12 hodinách elicítace byl v médiu detekován silydianin (0,220 mg/100 ml) a po 24 hodinách silybin A (0,380 mg/100 ml).

Zvýšený obsah flavonolignanů v kalusové kultuře byl zjištěn po všech dobách působení elicitoru v koncentraci  $C_2$ , s výjimkou elicítace po dobu 72 a 168 hodin (viz Tabulka 2). Po 168 hodinách elicítace však docházelo k významnému uvolňování

flavonolignanů do živného média a to silydianinu v množství 0,790 mg/100 ml (viz Tabulka 6). Nejvyšší obsah silychristinu (0,280 mg.g<sup>-1</sup> DW) po působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub> byl detekován po 24 hodinách, kdy došlo k více jak dvojnásobnému zvýšení jeho obsahu v porovnání s předešlou dobou elicitace 12 hodin. K dalšímu statisticky významnému zvýšení obsahu silychristinu došlo po 6 (0,142 mg.g<sup>-1</sup> DW), 12 (0,129 mg.g<sup>-1</sup> DW) a 48 (0,099 mg.g<sup>-1</sup> DW) hodinách. Ostatní složky silymarinového komplexu nebyly po působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub> detekovány.

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů po elicitaci roztokem o koncentraci C<sub>3</sub> docházelo stejně jako u předešlé koncentrace po všech dobách jeho působení, kromě 48 a 72 hodin (viz Tabulka 2). Nejvyšší obsah silymarinového komplexu byl naměřen po 12 hodinách elicitace (0,271 mg.g<sup>-1</sup> DW), kdy byl zvýšen obsah silydianinu a silybinu B. Zvýšený obsah silydianinu byl zaznamenán také po 6 hodinách elicitace (0,064 mg.g<sup>-1</sup> DW) a silybinu B po 168 hodinách elicitace (0,110 mg.g<sup>-1</sup> DW). Ke zvýšení obsahu silychristinu došlo pouze po 24 hodinách elicitace (0,130 mg.g<sup>-1</sup> DW). K uvolňování flavonolignanů do živného média při elicitaci roztokem o koncentraci C<sub>3</sub> nedocházelo.

V kalusové kultuře docházelo také ke zvyšování obsahu taxifolinu, přičemž k nejmenším nárůstům jeho obsahu docházelo při elicitaci roztokem o koncentraci C<sub>1</sub>. K nejvýznamnějšímu zvýšení obsahu taxifolinu (1,761 mg.g<sup>-1</sup> DW) došlo po 24 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub> (Tabulka 2, Graf 2). K jeho uvolňování z kalusových kultur do živného média nedocházelo.

### Suspenzní kultura

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů došlo po 6 a 12 hodinách působení elicitoru o koncentraci C<sub>1</sub> a po 24 a 48 hodinách působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub>. Roztok elicitoru o koncentraci C<sub>3</sub> statisticky významné zvýšení obsahu flavonolignanů nezpůsobil (viz Tabulka 3).

Největší nárůst obsahu flavonolignanů byl pozorován po 24 hodinách (0,958 mg.g<sup>-1</sup> DW) a 48 hodinách (1,871 mg.g<sup>-1</sup> DW) elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub>, kdy se tento obsah flavonolignanů zvýšil z nulových hodnot po 6 a 12 hodinách elicitace. Další významné zvýšení obsahu flavonolignanů nastalo po 6 hodinách (0,194 mg.g<sup>-1</sup> DW) a 12 hodinách (0,234 mg.g<sup>-1</sup> DW) působení elicitoru o koncentraci C<sub>1</sub>. Pro zvýšení produkce flavonolignanů u suspenzní kultury se tedy jeví nejlépe elicitor o koncentraci C<sub>2</sub> a doba elicitace 48 hodin (viz Tabulka 3, Graf 3).

Při elicitaci roztokem o koncentraci C<sub>1</sub> došlo k nejvyššímu nárůstu obsahu silychristinu (0,194 mg.g<sup>-1</sup> DW) po 6 hodinách a silydianinu (0,234 mg.g<sup>-1</sup> DW) po 12 hodinách jeho působení. Obsah ostatních složek silymarinového komplexu nebyl ovlivněn a k uvolňování flavonolignanů do živného média nedocházelo (viz Tabulka 3, Tabulka 7).

Nejvyšší obsah silychristinu při elicitaci roztokem o koncentraci  $C_2$  byl detekován po 48 hodinách jeho působení ( $1,618 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ), kdy došlo i ke zvýšení obsahu silydianinu ( $0,253 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). Další významné zvýšení produkce silychristinu ( $0,958 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) bylo zjištěno po 24 hodinách elicitace (viz Tabulka 3). Obsah ostatních složek silymarinového komplexu se působením elicitoru v koncentraci  $C_2$  nezvyšoval. K uvolňování flavonolignanů do živného média stejně jako u předešlé koncentrace elicitoru nedocházelo.

Při elicitaci roztokem elicitoru o koncentraci  $C_3$  nebylo v suspenzních kulturách zaznamenáno žádné významné zvýšení obsahu flavonolignanů. Docházelo však k jejich uvolňování do živného média. Po 12 hodinách elicitace zde bylo detekováno  $1,920 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  silychristinu,  $0,710 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  silydianinu a  $0,190 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  silybinu A (viz Tabulka 7).

U suspenzních kultur docházelo také ke zvyšování obsahu taxifolinu. Nejvyšší nárůst jeho obsahu nastal po působení elicitoru v koncentraci  $C_2$ , a to po 24 ( $5,910 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) a 48 ( $5,189 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) hodinách (viz Tabulka 3, Graf 4). Docházelo také k uvolňování taxifolinu do živného média, a to po 48 a 168 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $C_2$  a 6 a 12 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $C_3$  (viz Tabulka 7).

#### Porovnání působení elicitoru na kalusové a suspenzní kultury

U kalusové kultury došlo k nejvyššímu nárůstu obsahu flavonolignanů ( $0,280 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) po 24 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $C_2$ , u suspenzní kultury po 48 hodinách elicitace roztokem o téže koncentraci ( $1,871 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). U suspenzní kultury došlo v porovnání s kalusovou kulturou k více jak šestinásobně vyššímu nárůstu obsahu flavonolignanů, u kalusové kultury byl však jejich nárůst rovnoměrnější v průřezu jednotlivých odběrových časů (viz Graf 1, Graf 3).

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu taxifolinu docházelo u kalusových i suspenzních kultur. Jeho nejvyšší nárůst u kalusových kultur ( $1,761 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) byl zaznamenán po 24 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $C_2$ , stejně tak u suspenzních kultur ( $5,910 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ), u kterých byl ale jeho obsah nalezen trojnásobně vyšší (viz Graf 2, Graf 4).

K uvolňování flavonolignanů do živného média docházelo u kalusových i suspenzních kultur, taxifolinu pouze u kultur suspenzních. Z flavonolignanů byl v živném médiu detekován zejména silydianin. U kalusových kultur byl zde jeho nejvyšší obsah zjištěn po 168 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $C_2$  ( $0,790 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ), u suspenzních kultur po 12 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $C_3$  ( $0,710 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ). Na rozdíl od kalusových kultur došlo u kultur suspenzních také k uvolnění silychristinu, a to po 12 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $C_3$  ( $1,920 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ). K uvolňování taxifolinu do živného média docházelo pouze u suspenzních kultur a to po elicitaci roztokem o koncentraci  $C_2$  a  $C_3$ .

### Další studie působení derivátů pyrazin-2-karboxamidu jako elicitorů

Vliv derivátů pyrazin-2-karboxamidu na produkci sekundárních metabolitů explantátových kultur rostliny *Silybum marianum* byl sledován již v řadě studií.

Byl zkoumán efekt *N*-(3-iodo-4-methylphenyl)pyrazin-2-karboxamidu na produkci sekundárních metabolitů kalusové kultury. Nejvyšší nárůst obsahu flavonolignanů (zejména silychristinu) a taxifolinu byl pozorován po 6 hodinách elicítace roztokem tohoto elicitoru o koncentraci  $2, 95 \cdot 10^{-4}$  mol/l, kdy byl detekován trojnásobně vyšší obsah silychristinu v porovnání s kontrolou (0,08 %). Statisticky významný nárůst obsahu taxifolinu nastal také po 24 hodinách (detekován jeho třináctkrát vyšší obsah v porovnání s kontrolou – 0,08 %) a 72 hodinách (desetkrát vyšší obsah v porovnání s kontrolou – 0,58 %) elicítace jeho roztokem o koncentraci  $2, 95 \cdot 10^{-5}$  mol/l. (12)

Dále byl sledován vliv *N*-(3-iodo-4-methylphenyl)-5-*terc*-butyl-pyrazin-2-karboxamidu na produkci flavonolignanů a taxifolinu kalusových kultur. Statisticky významný nárůst obsahu flavonolignanů (zejména silychristinu) byl pozorován po 72 hodinách elicítace roztokem tohoto elicitoru o koncentraci  $2, 53 \cdot 10^{-3}$  mol/l, kdy došlo k dvanáctinásobnému zvýšení jejich obsahu oproti kontrole (0,107 %). Statisticky významné zvýšení obsahu taxifolinu bylo pozorováno po 6 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $2, 53 \cdot 10^{-4}$  mol/l (třináctkrát zvýšený obsah ve srovnání s kontrolou – 0,08 %) a  $2, 53 \cdot 10^{-5}$  mol/l (čtyřikrát zvýšený obsah oproti kontrole – 0,021 %). (12)

Další látkou, jejíž efekt byl zkoumán na produkci sekundárních metabolitů explantátových kultur *Silybum marianum*, je 3-methylamid-5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylová kyselina. Sledoval se její vliv na produkci flavonolignanů při použití různých růstových regulátorů. Tato sloučenina v koncentraci  $3, 71 \cdot 10^{-5}$  mol/l po 48 hodinách elicítace zvyšovala produkci flavonolignanů suspenzní kultury 2,5 krát více v porovnání s kontrolou (0,081 %). Jako růstový regulátor zde byl použit  $\alpha$ -NAO. V kalusové kultuře se stejným růstovým regulátorem došlo k významnému zvýšení (1,5 krát vůči kontrole) po 12 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $3, 71 \cdot 10^{-7}$  mol/l (0,066 %). Po použití růstového regulátoru 2,4-D se obsah flavonolignanů nejvíce zvýšil po 24 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $3, 71 \cdot 10^{-6}$  mol/l, kdy došlo k jeho 3,5 krát zvýšení vůči kontrole (0,065 %). (35)

Další látkou, která zvyšovala produkci flavonolignanů, je 5-brom-2-hydroxyphenylamid 5-*terc*-butyl-6-chloropyrazin-2-karboxylové kyseliny. Tato látka v roztoku o koncentraci  $2, 59 \cdot 10^{-4}$  mol/l vedla po 24 hodinách elicítace k desetinásobnému zvýšení obsahu flavonolignanů v kalusové kultuře (0,033 %). K významným nárůstům obsahu flavonolignanů docházelo též po 12 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $2, 59 \cdot 10^{-4}$  mol/l a 12 a 24 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $2, 59 \cdot 10^{-5}$  mol/l. (35)

Jako elicitor byl také zkoumán 5-(2-hydroxybenzoyl)-pyrazin-2-karboxamid, který nejvíce zvyšoval produkci flavonolignanů a zejména silydianinu (0,11 %) v suspenzní kultuře po 24 hodinách elicítace o koncentraci  $1, 159 \cdot 10^{-3}$  mol/l. V kalusové kultuře byl nejvyšší obsah flavonolignanů (0,08 %) detekován po 168 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $1, 159 \cdot 10^{-4}$  mol/l. (38)

Sloučenina (3-iodo-4-methylphenyl)amid 5-*terc*-butyl-6-chloropyrazin-2-karboxylové kyseliny nejvíce zvyšovala produkci flavonolignanů v kalusové kultuře

*Silybum marianum* po 168 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $2,33 \cdot 10^{-4}$  mol/l (0,05 %). V suspenzní kultuře nebyl detekován žádný významný nárůst obsahu flavonolignanů. (43)

Účinek derivátů pyrazin-2-karboxamidu byl zkoumán též u explantátových kultur rostliny *Genista tinctoria* (kručinka barvířská) (36) a *Ononis arvensis* (jehlice rolní) (38). Sloučeniny *N*-(3-iodo-4-methylphenyl)pyrazin-2-karboxamid a 5-*terc*-butyl-6-chlor-*N*-(3-iodo-4-methylphenyl)pyrazin-2-karboxamid zvyšovaly produkci isoflavonoidů kalusové kultury *Genista tinctoria*. (36) Látka *N*-(2-bromo-3-methylphenyl)-5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxamid zvyšovala produkci flavonoidů kalusové kultury *Ononis arvensis*, kdy došlo k nejvyššímu nárůstu obsahu po 168 hodinách elicitace roztokem o koncentraci  $8,36 \cdot 10^{-6}$  mol/l. U suspenzní kultury došlo k nejvyšší produkci flavonoidů po 48 hodinách elicitace roztokem o stejné koncentraci. (38)

## 7 ZÁVĚR

Výsledky studie působení potenciálního elicitoru 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamidu lze shrnout následovně:

- U kalusové kultury byly při elicitaci roztokem 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamidu detekovány tyto sekundární metabolity – taxifolin, silychristin, silydianin a silybin A a silybin B.
- U suspenzní kultury byly po působení elicitoru 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamidu detekovány tyto sekundární metabolity – taxifolin, silychristin, silydianin a silybin A.
- Nejvyšší produkce flavonolignanů (0,280 mg.g<sup>-1</sup> DW) u kalusové kultury nastala po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub>.
- Nejvyšší produkce flavonolignanů (1,871 mg.g<sup>-1</sup> DW) u suspenzní kultury nastala po 48 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub>.
- V kalusové kultuře nastala maximální produkce silychristinu (0,280 mg.g<sup>-1</sup> DW) po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub> a silydianinu (0,140 mg.g<sup>-1</sup> DW) a silybinu B (0,131 mg.g<sup>-1</sup> DW) po 12 hodinách působení elicitoru o koncentraci C<sub>3</sub>.
- V suspenzní kultuře byla pozorována maximální produkce silychristinu (1,618 mg.g<sup>-1</sup> DW) a silydianinu (0,253 mg.g<sup>-1</sup> DW) po 48 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub>.
- Nejvyšší obsah taxifolinu (1,761 mg.g<sup>-1</sup> DW) v kalusové kultuře byl zjištěn po 24 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub>.
- Nejvyšší obsah taxifolinu (5,910 mg.g<sup>-1</sup> DW) u suspenzní kultury byl naměřen stejně jako u kultury kalusové po 24 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub>.
- V živném médiu kalusové kultury byl detekován silydianin po 12 hodinách působení elicitoru o koncentraci C<sub>1</sub> a 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub> a silybin A po 24 hodinách působení roztoku o koncentraci C<sub>1</sub>.
- V živném médiu suspenzní kultury byl detekován silychristin, silydianin a silybin A po 12 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>3</sub> a taxifolin po 48 a 168 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>2</sub> a 6 a 12 hodinách elicitace roztokem o koncentraci C<sub>3</sub>.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>HPLC</b>	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
<b>HMGR</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktáza
<b>ACEi</b>	inhibitory angiotenzin konvertujícího hormonu
<b>MS médium</b>	Murashige a Skoog médium
<b>IAA</b>	indolyl-3-octová kyselina
<b>IBA</b>	indolyl-3-máselná kyselina
<b>2,4-D</b>	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
<b><math>\alpha</math>-NAO</b>	$\alpha$ -naftyloctová kyselina
<b>GA<sub>3</sub></b>	kyselina giberelová
<b>2iP</b>	6-dimethylaminopurin
<b>BAP</b>	6-benzylaminopurin
<b>ABA</b>	kyselina abscisová
<b>LS médium</b>	Linsmaier a Skoog médium
<b>B5 médium</b>	Gamborg médium
<b>NN médium</b>	Nitsch a Nitsch médium
<b>EDTA</b>	etylendiamintetraoctová kyselina
<b>LL</b>	léčivé látky
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>HSP</b>	Heat Shock Proteins
<b>ASP</b>	Anaerobic Stress Proteins
<b>PRP</b>	Pathogenesis-Related Proteins

## 9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 <i>Navážky jednotlivých suspenzních a kalusových kultur [g]</i> .....	38
Tabulka 2 <i>Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře</i> .....	44
Tabulka 3 <i>Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře</i> .....	45
Tabulka 4 <i>Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře a statistické zpracování výsledků</i> .....	46
Tabulka 5 <i>Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře a statistické zpracování výsledků</i> .....	47
Tabulka 6 <i>Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu kalusových kultur</i> .....	48
Tabulka 7 <i>Obsah taxifolinu a jednotlivých složek silymarinového komplexu [mg/100ml] v živném médiu suspenzních kultur</i> .....	49

## 10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Biosyntéza silybinu .....	14
Obrázek 2 Chemická struktura silymarinového komplexu.....	15
Obrázek 3 Kyselina indolyl-3-octová .....	23
Obrázek 4 Struktura ent-giberelanového skeletu .....	24
Obrázek 5 cis-ABA .....	25
Obrázek 6 5-terc-butyl-N-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid.....	31
Obrázek 7 Kalibrační křivka taxifolinu .....	39
Obrázek 8 Kalibrační křivka silychristinu .....	39
Obrázek 9 Kalibrační křivka silydianinu .....	40
Obrázek 10 Kalibrační křivka silybinu A.....	40
Obrázek 11 Kalibrační křivka silybinu B.....	40
Obrázek 12 Kalibrační křivka isosilybinu A .....	41
Obrázek 13 Kalibrační křivka isosilybinu B .....	41
Obrázek 14 HPLC chromatogram standardu silymarinu.....	42

## 11 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 <i>Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře Silybum marianum po působení různých koncentrací elicitoru .....</i>	50
Graf 2 <i>Obsah taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v kalusové kultuře Silybum marianum po působení různých koncentrací elicitoru .....</i>	50
Graf 3 <i>Obsah silymarinového komplexu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře Silybum marianum po působení různých koncentrací elicitoru .....</i>	51
Graf 4 <i>Obsah taxifolinu [mg.g<sup>-1</sup> DW] v suspenzní kultuře Silybum marianum po působení různých koncentrací elicitoru .....</i>	51

## 12 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. **Jahodář L.** *Farmakobotanika - semenné rostliny*. Praha : Karolinum, 2006. str. 169.
2. **Korbelář J., Endris Z.** *Naše rostliny v lékařství*. Praha : Avicenum, 1981. str. 306-307.
3. **Tůmová L., Řimáková J., Tůma J., Dušek J.** *Silybum marianum in vitro - flavonolignan production*. *Plant Soil Environment*. 2006, 52 (10), 454-458.
4. **Farkaš L.** Pestrec mariánský - história, súčasnosť a perspektiva. *Liečivé rastliny*. 2012, 2.
5. **Křen V., Walterová D.** Silybin and silymarin - new effects and applications. *Biomedical Papers*. 2005, 149 (1), 29-41.
6. **Kresánek J.** *Atlas liečivých rastlín a lesných plodov*. Martin : Osveta, 1982. str. 542-543.
7. **Corchete P., Bru R.** Proteome alterations monitored by DIGE analysis in *Silybum marianum* cell cultures elicited with methyl jasmonate and methyl B cyclodextrin. *Journal of proteomics*. 2013, 85, 99-108.
8. **Kolektiv autorů.** *Český lékopis 2009, 3. díl*. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2009. str. 3144-3146.
9. **Elwekeel A., AbouZid S., Sokkar N., Elfishway A.** Studies on flavonolignans from cultured cells of *Silybum marianum*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2012, 12, 1445-1449.
10. **AbouZid S.** Silymarin, natural flavonolignans from milk thistle. *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*. [Online] 2012, 255-267. [Citace: 27. 11. 2013.] <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/silymarin-natural-flavonolignans-from-milk-thistle>.
11. **Tůmová L., Tůma J.** Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. *Chemické listy*. 2009, 103. str. 503-510.
12. **Tůmová L., Tůma J., Megušar K., Doležal M.** Substituted pyrazincarboxamides as abiotic elicitors of flavonolignan production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cultures *in vitro*. *Molecules*. 2010, 15 (1), 331-340.
13. **Shaker E., Mahmoud H., Mnaa S.** Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, 48, 803-806.

14. **Bokemeyer C., Fels L.M., Dunn T., Voigt W., Gaedeke J., a kol.** Silibinin protects against cisplatin - induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti - tumor activity. *British Journal of Cancer*. 1996, 74 (12), 2036-2041.
15. **Soto C., Recoba R., Barrón H., Alvarez C., Favari L.** Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan - induced *diabetes* in rat *pancreas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 2003, 136 (3), 205-212.
16. **Fallahzadeh M.K., Dormanesh B., Sagheb M.M., Roozbeh J., a kol.** Effect of addition of silymarin to renin-angiotensin system inhibitors on proteinuria on type 2 diabetic patients with overt nephropathy: A randomized, double - blind, placebo - controlled trial. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012, 60 (6), 896-903.
17. **Anupom B., Rajib P., Sabanum Ch., Amarendranath Ch, a kol.** Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: Insight into the pathways and molecular mechanism of action. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2013, 19 (11), 847-853.
18. **Theriault A., Wang Q., Van Inderstine S.C., Chen B., Franke A.A., Adeli K.** Modulation of hepatic lipoprotein synthesis and secretion by taxifolin, a plant flavonoid. *The Journal of lipid research*. 2000, (41), 1969-1979.
19. **Maitrejean M., Comte G., Barron D., El Kirat K., Gwenaelle C., Di Pietro A.** The flavanolignan silybin and its hemisynthetic derivatives, a novel series of potential modulators of P-glycoprotein. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2000, 10 (2), 157-160.
20. **AISLP.** Mikro - verze AISLP, 2013.3 pro MS Windows.
21. **Cufí S., Bonavia R.R., Vazquez-Martin A., Corominas-Faja B.** Silibinin meglumine, a water - soluble form of milk thistle silymarin, is an orally active anti - cancer agent that impedes the epithelial - to - mesenchymal transition (EMT) in EGFR - mutant non - small - cell lung carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, 60, 360-368.
22. **Hussain A., Qarshi I.A., Nazir H., Ullah I.** Plant tissue culture: Current status and opportunities - Recent advances in plant *in vitro* culture. *INTECH open*. [Online] 2012, 1-4, 8, 9, 11. [Citace: 6. 12. 2013.] <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-current-status-and-opportunities>.
23. **Procházka S., Šebánek J.** *Regulátory rostlinného růstu*. Praha : Akademie věd České republiky, 1997. str. 149-161.
24. **Kováč J.** *Explantátové kultury rostlin*. Olomouc : Univerzita Palackého, 1995. str. 1-12.

25. **Katedra experimentální biologie rostlin.** Kultivace *in vitro*. UK Praha, Přírodovědecká fakulta. [Online] 2012. [Citace: 6. 12. 2013.]  
[http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika\\_fr/mb130c14/c14\\_index.htm](http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c14/c14_index.htm).
26. **Sovová M.** *Vybrané kapitoly z produkce léčivých rostlin*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1990. str. 86.
27. **Mineo L.** Plant tissue culture techniques. [Online] 1990, 164-167. [Citace: 27. 12. 2013.] <http://www.ableweb.org/volumes/vol-11/>.
28. **Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J.** Fyziologie rostlin. *Regulace růstu*. [Online] 2004. [Citace: 6. 12. 2013.]  
<http://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html>.
29. **Saad A.I.M., Elshahed A.M.** Plant tissue culture media - Recent advances in plant *in vitro* culture. *INTECH open*. [Online] 2012, 29-38. [Citace: 10. 12. 2013.]  
<http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>.
30. **Gaosheng H., Jingming J.** Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants - Recent advances in plant *in vitro* culture. *INTECH open*. [Online] 2012, 197-199, 205-206. [Citace: 14. 12. 2013.] <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/production-of-useful-secondary-metabolites-through-regulation-of-biosynthetic-pathway-in-cell-and-ti>.
31. **Ramakrishna A., Ravishankar G.A.** Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling and behavior*. 2011, 6 (11), 1720-1731.
32. **Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., a kol.** *Fyziologie rostlin*. Praha : Academia, 1998. str. 412-430.
33. **Ashtiani S.R., Hasanloo T., Bihamta M.R.** Enhanced production of silymarin by Ag<sup>+</sup> elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. *Pharmaceutical biology*. 2010, 48 (6), 708-715.
34. **Sánchez-Sampedro A., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R., Corchete P.** Metabolic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Biotechnology*. 2007, 130 (2), 133-142.
35. **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 (3), 357-362.

36. **Tůmová L., Tůma J., Doležal M., Danielová B.** Deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny jako účinné abiotické elicitory produkce isoflavonoidů. *Česká a slovenská farmacie*. 2010, 59 (3). str. 117-122.
37. **Doležal M., Palek L., Vinsova J., Buchta V., a kol.** Substituted pyrazinkarboxamides: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*. 2006, 11 (4), 242-256.
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. **Klimeš J., Sochor J., Mokrý M., Kastner P., Pilařová P.** *Kontrola léčiv I.* Praha : Karolinum, 2006. str. 33-37.
40. **Klimeš J., Sochor J., Mokrý M., Kastner P., Pilařová P.** *Kontrola léčiv II.* Praha : Karolinum, 2007. str. 73-82.
41. **Reisenauer R.** *Metody matematické statistiky.* Praha : SNTL, 1970. str. 78-81.
42. **Klemera P., Klemerová V.** *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie.* Praha : Karolinum, 1997. str. 23, 27.
43. **Špandelová V.** *Kultury léčivých rostlin in vitro - VIII.* Hradec Králové : Diplomová práce, FaF UK, 2010.

## 13 ABSTRAKT

### *Kultury léčivých rostlin in vitro - XVI*

Tématem této diplomové práce je ovlivňování produkce sekundárních metabolitů explantátové kultury *Silybum marianum*, (L.) Gaertn. metodou elicítace. Účelem bylo zjistit, zda zadaný abiotický elicítor 5-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamid zvýší produkci flavonolignanů explantátové kultury. Experiment byl prováděn *in vitro* na kalusových a suspenzních kulturách léčivé rostliny *Silybum marianum* za použití živného média Murashigeho a Skooga s přídatkem 10 mg/l  $\alpha$ -naftylactové. Elicítor se přidával ve formě roztoku o třech různých koncentracích ( $C_1 = 3, 292 \cdot 10^{-3}$  mol/l,  $C_2 = 3, 292 \cdot 10^{-4}$  mol/l a  $C_3 = 3, 292 \cdot 10^{-5}$  mol/l) a působil po dobu 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Obsah flavonolignanů byl zjišťován pomocí HPLC. Maximální produkce flavonolignanů (0, 280 mg.g<sup>-1</sup> DW) v kalusové kultuře nastala po 24 hodinách působení elicítoru o koncentraci  $C_2 = 3, 292 \cdot 10^{-4}$  mol/l, kdy byl zjištěn zároveň nejvyšší obsah silychristinu. Druhé nejvýznamnější zvýšení obsahu flavonolignanů (0, 271 mg.g<sup>-1</sup> DW) v kalusové kultuře nastalo po 12 hodinách působení elicítoru o koncentraci  $C_3 = 3, 292 \cdot 10^{-5}$  mol/l, kdy došlo také k nejvyššímu nárůstu obsahu silydianinu a silybinu B. Maximální obsah flavonolignanů (1, 871 mg.g<sup>-1</sup> DW) v suspenzní kultuře byl zjištěn po 48 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $C_2 = 3, 292 \cdot 10^{-4}$  mol/l, kdy došlo k maximální produkci silychristinu a silydianinu. U kalusových i suspenzních kultur docházelo také k uvolňování flavonolignanů do živného média. U kalusových kultur se do živného média uvolňoval silydianin a to zejména po 168 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $C_2 = 3, 292 \cdot 10^{-4}$  mol/l a silybin A po 24 hodinách elicítace roztokem o koncentraci  $C_1 = 3, 292 \cdot 10^{-3}$  mol/l. U suspenzní kultury docházelo k nejvýznamnějšímu uvolňování flavonolignanů po 12 hodinách působení elicítoru v koncentraci  $C_3 = 3, 292 \cdot 10^{-5}$  mol/l, kdy byla zjištěna přítomnost silychristinu, silydianinu a silybinu A.

## 14 ABSTRACT

### *Medicinal plant cultures in vitro – XVI*

The subject of this diploma thesis is the evaluation of secondary metabolites production in *Silybum marianum*, (L.) Gaertn. cultures *in vitro* after elicitor treatment. The aim of the study was to find if an abiotic elicitor 5-*tert*-butyl-*N*-(4-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide increases the flavonolignan production *Silybum marianum* cultures *in vitro*. Experiment was carried out in callus and suspension cultures of *Silybum marianum* using Murashige – Skoog nutrient medium supplemented with 10 mg/l  $\alpha$ -naphthylacetic acid. The elicitor was added in the form of solution in three different concentrations ( $C_1 = 3.292 \cdot 10^{-3}$  mol/l,  $C_2 = 3.292 \cdot 10^{-4}$  mol/l and  $C_3 = 3.292 \cdot 10^{-5}$  mol/l) and it was affecting 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours. The content of flavonolignans was determined by HPLC. The maximum flavonolignan production (0.280 mg.g<sup>-1</sup> DW) in callus culture was observed after 24 hours of elicitor application in concentration of  $C_2 = 3.292 \cdot 10^{-4}$  mol/l, when the highest content of silychristin was detected. The second significant increase in flavonolignan production (0.271 mg.g<sup>-1</sup> DW) in callus culture was noticeable after 12 hours of elicitor treatment in concentration of  $C_3 = 3.292 \cdot 10^{-5}$  mol/l, when the highest increase in silydianin and silybin B accumulation was found. The maximum content of flavonolignan (1.871 mg.g<sup>-1</sup> DW) in suspension culture was detected after 48 hours of elicitor treatment in concentration of  $C_2 = 3.292 \cdot 10^{-4}$  mol/l, when the maximum production of silychristin and silydianin was observed. Flavonolignan release into the nutrient medium was also detected. In the case of callus cultures, the silydianin release was obvious especially after 168 hours of elicitor addition in concentration of  $C_2 = 3.292 \cdot 10^{-4}$  mol/l and silybin A after 24 hours of elicitor treatment in concentration of  $C_1 = 3.292 \cdot 10^{-3}$  mol/l. The most significant increase of flavonolignan release from suspension culture into nutrient medium was found after 12 hours of elicitor treatment in concentration of  $C_3 = 3.292 \cdot 10^{-5}$  mol/l, when the presence of silychristin, silydianin and silybin A was detected.