

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

Veronika Deščíková

Transport flavonoidů přes buněčné membrány I.

(Diplomová práce)

Datum zadání: 30.11.2005

Datum odevzdání: 15.5.2007

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jan Martin, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Oponent:

Děkuji svému školiteli Mgr. Janu Martinovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, vytvoření přátelské pracovní atmosféry a trpělivost v průběhu celého vytváření mé diplomové práce. Děkuji také katedře farmakognozie za ochotu pomoci a přístrojové zabezpečení experimentální části diplomové práce.

Veronika Deščíková

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE	6
3. TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1. <i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGII (šišák bajkalský).....	7
3.1.1. Botanický popis rostliny	7
3.1.2. Droga a její užití.....	8
3.1.3. Obsahové látky.....	8
3.1.4. Biologické účinky	9
3.2. Biosyntéza flavonoidů.....	13
3.3. Rostlinné kultury <i>in-vitro</i>	16
3.3.1. Explantátové kultury rostlin.....	16
3.3.2. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů	17
3.4. Transportní mechanismy flavonoidů	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1. Použité chemikálie a přístroje	24
4.1.1. Chemikálie	24
4.1.2. Přístroje a chromatografické doplňky	24
4.2. Kultivace a pasážování suspenzních kultur <i>S. baicalensis</i>	25
4.3. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu	26
4.3.1. Příprava vzorků	26
4.3.2. HPLC analýza	27
4.3.3. Validace HPLC analýzy	29
4.4. Vliv vybraných elicitorů na produkci sekundárních metabolitů	29
4.4.1. Sledování vlivu glutathionu	29
4.4.2. Sledování vlivu kyanidu draselného bez a v přítomnosti peroxidu vodíku	30
4.4.3. Sledování vlivu orthovanadátu.....	30
4.5. Statistické zpracování výsledků	30
5. VÝSLEDKY	32
5.1. Vliv redukované formy glutathionu v různých koncentracích na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře.....	32
5.2. Obsah flavonoidů v médiu po expozici suspenzní kultury různé koncentraci glutathionu	35
5.3. Vliv orthovanadátu na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře.....	36
5.4. Vliv kyanidu draselného za přítomnosti peroxidu vodíku na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře	39
6. DISKUZE	42
7. ZÁVĚR	45
8. LITERATURA	46
9. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA	50

1. ÚVOD

Léčivé rostliny a jejich účinky jsou poznávány již dlouhá století. Rozsáhlé znalosti měli už Sumerové, Asyřané a Babyloňané. Asyřané znali už asi 250 rostlinných drog a pěstovali léčivé rostliny pro svou potřebu.⁽¹⁾ Mnoho drog bylo známo též obyvatelům jihovýchodní Asie, hlavně v oblasti Číny. V tradiční čínské medicíně se používalo 230 léčivých rostlin a další živočišné a minerální produkty. Jednou z rostlin čínské medicíny, která byla evropskou farmacií a medicínou objevena teprve nedávno je i rostlina *Scutellaria baicalensis* G. (šišák bajkalský), o které pojednává tato diplomová práce.

S postupným rozvojem chemie a především znalostí organické syntézy upadala přírodní léčiva do zapomnění. Převahu získala léčiva syntetická, řada z nich však vznikla pouhou obměnou struktury přírodní látky. Dnes probíhá určitá renesance v používání léčiv přírodního původu, objevují a izolují se látky nové, některé také farmaceuticky významné a léčivé rostliny jsou surovinou pro přípravu čajových směsí a galenik (tinkтуры, odvary).

Původně se drogy získávaly z planě rostoucích rostlin, v současnosti jsou hlavním zdrojem polní kultury léčivých rostlin. K této metodě se přistoupilo z důvodu nedostatečné produkce planě rostoucích rostlin, neschopnosti kvantitativní a kvalitativní kontroly obsahu, riziku záměny, případně falšování rostlin. Ani tyto kultury však nejsou úplně vyhovující. Jako monokultury jsou velmi často napadány škůdci a případné použití pesticidů či herbicidů může mít negativní vliv na kvalitu drogy. Také nestálost počasí a kvalita půdního fondu jsou faktory člověkem prakticky neovlivnitelné, a proto se čím dál častěji mluví o biotechnologické produkci rostlinných drog. Její bezesporu největší výhody spočívají ve výsledné sterilní a homogenní biomase s očekávaným a stejnoměrným obsahem účinných látek ve standardizovaných podmínkách. Postupně se také přichází na nové metody zvýšení produkce in-vitro kultur, například elicítace, biotransformace, použití prekurzorů či genové manipulace.⁽²⁾

Přírodní léčivé látky využívané ve farmacii a medicíně jsou produkty souboru metabolických reakcí rostlinného organismu. Jde o produkty primárního

metabolizmu (sacharidy, vyšší mastné kyseliny, oleje, aminokyseliny, proteiny), které probíhají v celé rostlinné říši a jsou pro rostliny životně důležité. Druhou skupinu látek tvoří produkty sekundárního metabolismu (alkaloidy, silice, glykosidy, třísloviny, balzámy), které jsou specifické pro určité taxony, rostlinné orgány a různé ontogenetické fáze rostliny a zpravidla mají významné farmakologické účinky.⁽¹⁾

2. CÍL PRÁCE

Moje diplomová práce s názvem „Transport flavonoidů přes biologické membrány I.“ se zabývá tématem kultivace explantátových kultur šiřáku bajkalského a možnostmi ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v těchto kulturách.

Cílem práce bylo:

- 1) Zvládnout kultivaci suspenzních kultur rostliny *Scutellaria baicalensis* GEORGII
- 2) Zvládnout stanovení baicaleinu a baicalinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)
- 3) Experimentálně ověřit některé principy transportních mechanismů pro flavonoid baicalein, zejména vliv glutathionu, orthovanadátu a kyanidu draselného v přítomnosti H₂O₂

3. TEORETICKÁ ČÁST

Tradiční čínské lékařství je starým léčitelským systémem, jehož počátky sahají do období okolo r. 2500 před n.l. Během několika uplynulých let se čínská bylinná tradice stala na západě známější, a proto se začala věnovat větší vědecká pozornost i tradičním bylinám používaným v léčitelství. Objevují se tak nové obsahové látky a nové účinky již známých léčivých rostlin. Jednou z rostlin, ke které se upírá pozornost pro její širokospektré tradiční využití je i šišák bajkalský. V Číně je znám pod jménem „chuang čchin“ nebo „huang qin“ a v Japonsku jako „wogon“ a je používán již téměř dva tisíce let. První zmínka o této rostlině pochází z Shen Nongova kánonu léčivých rostlin, který je datován do období dynastie Han (25–220 po Kr.).⁽³⁾

3.1. *Scutellaria baicalensis* GEORGII (šišák bajkalský)

3.1.1. Botanický popis rostliny

Šišák bajkalský - *Scutellaria baicalensis* GEORGII je vytrvalá rostlina, která dorůstá do výšky 30 až 60 cm (některé prameny uvádějí výšku pouze 15 – 30 cm). Patří do čeledi *Lamiaceae* (hluchavkovité) a má všechny základní znaky skupiny. Lodyhy jsou čtyřhranné, bohatě se větví a jsou vystoupavé až poléhavé. Listy jsou křížmostojné, jednoduché, celokrajné a kopinaté, na dotyk tuhé a kožovité. Kořen je vřetenovitý, na povrchu hnědý, na řezu žlutý, asi 2 cm tlustý. Koruna je zřetelně dvoupyská. Na bázi je prohnutá vzhůru, spodní pysk je dvoulaločný, horní přilbovitý a chlupatý. Kalich má nahoře dutý štítkovitý přívěsek (*scutellum*), který je dobře patrný i u plodu. Šišák kvete koncem léta a na podzim nápadně modrými až fialovými květy, které jsou uspořádány do koncových jednostranných hroznů délky 7 – 15 cm. Plodem je černohnědá, drobná, diskovitá tvrdka.

Šišák bajkalský se původně vyskytuje v lesostepních oblastech Zabajkalí, na středním toku Amuru (Rusko), v Severní Koreji, Číně, severovýchodním Mongolsku a v Japonsku. Roste na otevřených, suchých a kamenitých stanovištích s přímým sluncem nebo v polostínu. I v našich podmínkách se dá bez problémů pěstovat, nevyžaduje zvláštní péči a dobře přezimuje.^(4,5)

3.1.2. Droga a její užití

Droga (*Scutellariae radix*) se získává z kořenů tříletých, nebo čtyřletých rostlin sbíraných na jaře nebo na podzim. Po očištění, odstranění zevní hrubé vrstvy a rozkrájení na menší kousky se suší v suchých místnostech přírodním nebo umělým teplem. Tradiční čínská medicína využívala šišáku při hypertenzi spojené s přehřátím, proti krvácení z nosu, vnitřnímu krvácení, při zánětech v krku, kašli, zvracení, silné menstruaci, kožních infekcích, také při záškrtu, spále a hepatitidě. Je také součástí tzv. „san chuang zhe she ye“ – směsi „tří žlutých bylin“, kde je kombinován s *Coptis chinensis* a *Phellodendron amurense*, tato směs se používá tradičně při žaludečních, prsních a močových infekcích.⁽³⁾

Dnes jsou kořeny této rostliny užívány jako antipyretika, antihypertenziva, antiflogistika, antialergika, sedativa a mírného hypnotika. Šišák bajkalský též slouží při odstraňování subjektivních symptomů, jako jsou bolesti hlavy a bolesti v oblasti srdce. Droga se užívá nejčastěji jako odvar, případně se z ní připravuje lihový extrakt. Denní dávka pro přípravu odvaru je 6 až 15 g, Lihový extrakt (60 až 80 g drogy na 1 litr 40% lihu) se užívá 4krát denně 1 polévkovou lžící po dobu šesti týdnů.⁽⁵⁾

Vedlejší účinky drogy nebyly zatím poznány.

3.1.3. Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami této rostliny jsou flavonoidy. Jsou přítomny hlavně ve formě glykosidů jako glukuronidy, méně často jako glukopyranosidy. Liší se od sebe různým počtem a postavením hydroxylových a methoxylových skupin. Celkem jich bylo v této rostlině identifikováno přes čtyřicet.

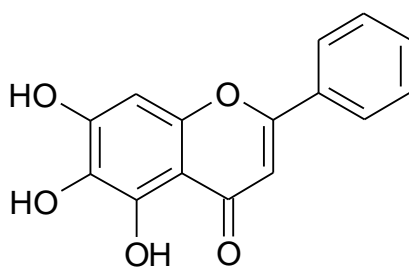
Obsah jednotlivých flavonoidů kolísá v rostlině s ročním obdobím i lokalitou sběru, nejvyšší obsah však vždy bývá u flavonoidu baicalinu.⁽⁶⁾ V kořeni je ho 12 – 17 %. Některé zdroje však uvádí podstatně nižší obsah - 4,3 %. Jeho aglykonem je baicalein.⁽⁷⁾ (viz struktura)

Významnými flavonoidními glykosidy jsou i wogonosid a scutellarin a jejich aglykony wogonin a scutellarein. Mezi další flavonoidy a isoflavonoidy pak patří oroxylin A, oroxylin A -7-O-glucuronid, scullcapflavon I a scullcapflavon II,

neobaicalein, dihydrobaicalin, dihydrooroxylin, dihydrooroxylin A, norwogonin, isowogonin, huangqin, carthamidin, isocarthamidin a další. ⁽⁸⁾

Z ostatních látek mimo flavonoidů byl v šiřáku prokázán obsah lignanového glykosidu, sesquilignanových glykosidů, silic, sitosterolů a aminokyselin. ⁽⁹⁾

Struktura baicaleinu:



3.1.4. Biologické účinky

Farmakologické výzkumy potvrdily, že za pozitivní vliv drogy na celou řadu onemocnění jsou odpovědné flavonoidy. Zejména baicalin, jeho aglykon baicalein a wogonin mají významné účinky odpovídající tradičnímu používání drogy. Flavonoidy z rostliny *Scutellaria baicalensis* GEORGII jsou skupinou látek s velmi širokou škálou biologických účinků. Především mají prokazatelnou protizánětlivou, antioxidační, antihypertenzivní, antibakteriální a antivirovou aktivitu. Mohou být využity pro podpůrnou léčbu hypertenze, aterosklerózy, prevenci vzniku trombóz, pro léčbu některých infekčních chorob, včetně AIDS. Velmi perspektivní se podle nejnovějších studií jeví použití baicaleinu proti nádorům prostaty, vykazuje také pozitivní efekt i proti některým typům rakoviny prsu a melanomů. ^(3,10,11)

Použití izolovaných flavonoidů v humánní medicíně je předmětem dalších výzkumů a klinicko-toxikologických testů.

Protizánětlivý a antihypertenzní účinek

Tyto dva účinky spolu vzájemně souvisí a jsou způsobeny stejným základním mechanismem - inhibicí enzymu lipoxygenázy.

Lipoxygenáza je enzym zapojený do metabolismu kyseliny arachidonové. Kyselina arachidonová je v počátečním stádiu zánětu uvolňována jako odpověď na mediátory z aktivovaných krevních destiček. Lipoxygenáza přeměňuje volnou

kyseliny arachidonovou na hydroperoxyeikosatetraennové kyseliny, z nichž vznikají leukotrieny, látky hrající významnou roli v zánětlivých procesech. Zvyšují permeabilitu cév, chemotakticky přitahují a aktivují neutrofilní granulocyty a společně s prostaglandiny vyvolávají odpověď organismu - zánět. Bylo prokázáno, že baicalein selektivně inhibuje 5- a 12- lipoxygenázu.^(12,13) Tímto způsobem blokuje oxidaci kyseliny arachidonové na 12-HPETE, 12-HETE (hydroperoxyeikosatetraennové kyseliny). Tím zabraňuje syntéze leukotrienů a nepřímo podporuje produkci prostaglandinu PG I₂. Jako inhibitor lipooxygenázy je baicalein využíván v řadě biochemických experimentů, zejména výzkumu kardiovaskulárního systému. Snižuje množství aktivovaného endothelinu-1, který je významným vasokonstriktorem a je schopen blokovat zvýšenou inkorporaci leucinu do srdečních fibroblastů, která obvykle předchází hypertrofii myokardu při hypertenzi.^(14,15,16,17,61)

U flavonoidu wogoninu bylo zjištěno, že kromě inhibice lipooxygenázy se na jeho protizánětlivém účinku podílí také schopnost inhibovat expresi MCP-1, proteinu účastnícího se zánětu jako chemotaktický faktor pro monocyty. Dále tento flavonoid ovlivňuje i produkci oxidu dusnatého v organismu, potlačením genové exprese enzymu iNOS (inducibile nitric oxide synthase).^(18,19,20,61)

Při experimentech na krysách a na buněčných kulturách *in vitro* se potvrdilo, že baicalein a další flavonoidy ze *Scutellaria baicalensis* omezují produkci leukotrienu B₄ (LTB₄) a leukotrienu C₄ (LTC₄), přítomnost kterých je charakteristická pro makrofágy při chronických zánětlivých onemocněních jako bronchiální astma, chronická bronchitida, chronická artritida, rakovina plic, záněty a nádory pojivových tkání, idiopatická pulmonální fibróza atd. Dále u kryš s hypertenzí způsobenou infuzí angiotenzinu II se po podání baicaleinu (60 mg/kg) zvýšila přeměna endogenního PG H₂ na PG I₂ a došlo k poklesu krevního tlaku. Na kryš s normálním krevním tlakem baicalein nepůsobil.^(21,61)

Antioxidační účinek a vychytávání volných radikálů

Volné radikály jsou látky schopné přímo poškozovat bílkoviny, nukleové kyseliny a lipidy. Iniciují peroxidaci lipidů, což vede k narušení buněčných membrán a organel. Vzniklé peroxidy pak působí stejně jako původní volné radikály.

U flavonoidů ze *Scutellaria baicalensis* byl zkoumána jejich aktivita proti hydroxylovému, alkylovému a DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl) radikálům⁽²²⁾, vliv na množství intracelulárních oxidantů po vystavení buněk desetiminutové hypoxii u lidských embryonálních kardiomyocytů⁽²³⁾, dále ochranný účinek flavonoidů proti peroxidu vodíku na lidských neuroblastomech a krysích neuronech^(24,25) a efekt proti fotoindukované peroxidaci lipidů na lipozomální membráně.⁽²⁶⁾ Studie prokázali, že účinek baicalinu a baicaleinu na inhibici peroxidace lipidů je asi 375-krát vyšší než účinek vitamínu E použitého jako standard⁽²⁷⁾, přičemž účinek wogoninu a wogonosidu je podstatně nižší. Tyto dva flavonoidy však blokují vznik některých látek iniciujících vznik volných radikálů.⁽²⁸⁾

Antibakteriální a antivirová aktivita

Z tradičního užívání drogy proti zánětům krčních mandlí a dutiny ústní vyplynul zájem studovat účinky extraktu i jednotlivých obsahových látek na bakterie a viry, které tato onemocnění obvykle vyvolávají. V pokusech *in vitro* i *in vivo* byla zjištěna aktivita proti celé řadě virů, retrovirů, bakterií a hub.

Nejúčinnější látkou se ukázal být baicalin, který je aktivní zejména proti chřipkovým virům a *Staphylococcus aureus*. Wogonin je v pokusech *in vitro* vysoce účinný proti viru hepatitidy B a proti RSV (respiratory syncytial virus). Z ostatních flavonoidů se testoval *in vitro* i isoscutellarein-8-methylester a ukázal se být účinný proti chřipkovým virům A a B. Extrakt z drogy je velmi účinný proti *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pitosporum ovale* a také proti trypanosomám a bakteriím způsobujícím zubní kazy.

Baicalin se ukázal být vysoce účinný také při léčbě a prevenci HIV infekce, protože zabraňuje vstupu viru do buňky svým navázáním na chemokinové koreceptory na buněčném povrchu a ovlivňuje expresi viru v napadených buňkách inhibicí reverzní transkriptázy.^(29,61)

Cytostatický a imunomodulační účinek

V současné době probíhá řada výzkumů na tkáňových kulturách, které mají za cíl prostudovat a ověřit schopnost baicaleinu zasahovat proti rakovinným buňkám stejně jako jeho další prospěšné vlastnosti při terapii nádorových onemocnění. Baicalein je pro svoji malou toxicitu a velkou účinnost perspektivní

látkou pro prevenci rakoviny a pro její léčbu v ranných stádiích.^(30,31) Tento účinek je kombinací dvou již výše zmíněných vlastností – antioxidační aktivity a antivirového působení v případě virové etiologie rakovinného onemocnění (např. Epstein-Baar virus).⁽³²⁾ K těmto mechanismům se připojuje další, zatím neznámý, který způsobuje, že baicalin zabraňuje i proliferaci již vzniklých nádorů. Účinný je zejména proti nádorům prostaty⁽³³⁾, kůže⁽³⁰⁾ a rakovině prsu.⁽³⁴⁾

Jiné účinky

Díky podobnosti fenylnbenzopyronového jádra flavonoidů s benzodiazepiny je umožněno navázání flavonoidů na benzodiazepinové vazebné místo na GABA_A receptorech. Nejpevněji se váže wogonin, což je projevuje výraznými anxiolytickými účinky drogy. Byla pozorována také antikonvulzivní aktivita vodného extraktu kořene, která však souvisí spíše se zabráněním šíření křečového stavu než s interakcí na GABA receptorech.^(35,36)

Z dalších účinků je významný vliv na fibrinolytický systém a potencionální použití šišáku v léčbě trombóz a aterosklerózy⁽³⁸⁾, antialergický účinek⁽³⁹⁾ propojen s účinkem protizánětlivým a inhibice xantinoxidázy⁽³⁷⁾, což by se potencionálně mohlo využít v léčbě dny.

Toxicita

Vedlejší účinky drogy nejsou zatím zcela poznány. Hepatotoxický efekt po požití bylinných směsí obsahujících šišák byl po bližším výzkumu vyvrácen. Poškození jater způsobila jiná složka (pravděpodobně germander z rostlin rodu *Teucrium*).⁽⁴⁰⁾

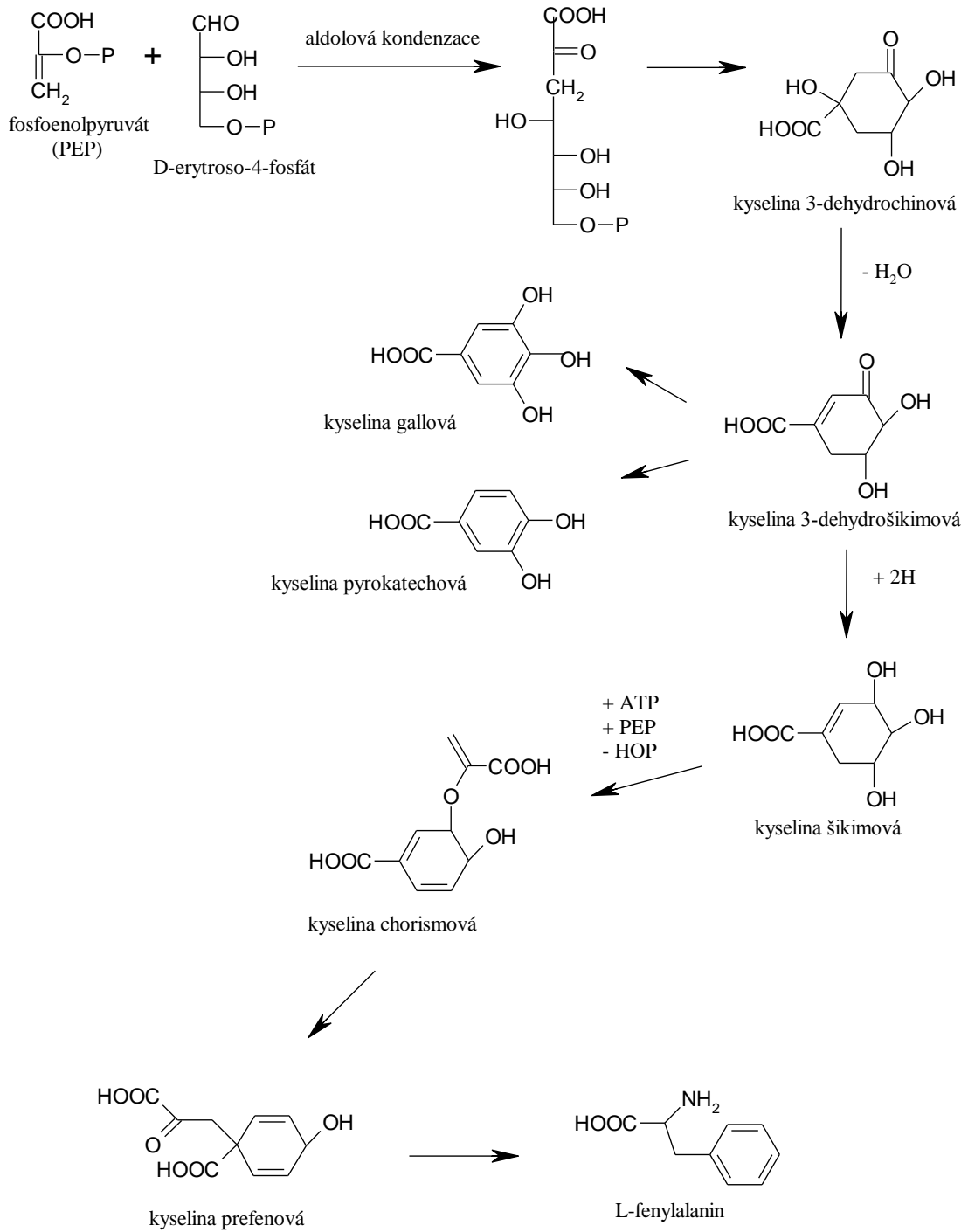
Není doporučováno dlouhodobé užívání drogy vzhledem k mírně mutagennímu efektu wogoninu a také užívání při těhotenství a laktaci, epilepsii a jiných poruchách CNS z důvodu nedostatku údajů o toxicitě a farmakologii obsahových látek.^(41,42)

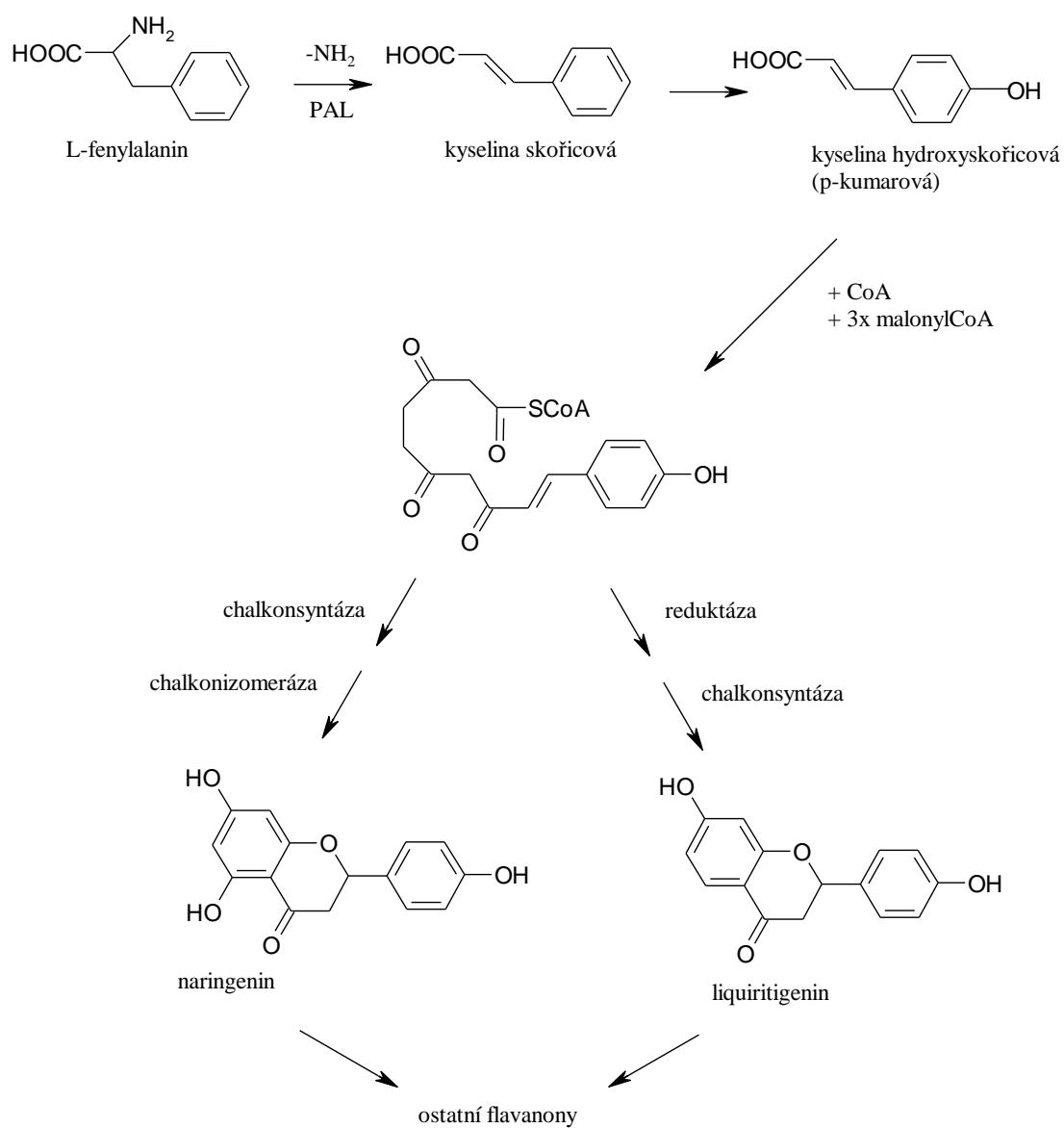
3.2 Biosyntéza flavonoidů

Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), v poloze 3 (izoflavany) a v poloze 4 (neoflavany). Nejčastěji se vyskytují jako flavany, v cévnatých rostlinách. Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavonoidy dělí na flavany, flaveny, flavanony, flavanoly, flavanonoly, flavandioly, flavony a flavonoly. Dále se flavonoidy liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin.⁽⁴³⁾

Biosyntéza flavonoidů vychází z metabolismu kyseliny šikimové. Šikimátová cesta probíhá jen u mikroorganismů a rostlin a jejími produkty jsou esenciální aminokyseliny, u živočichů přijímané jenom potravou. Biosyntéza začíná aldolovou kondenzací fosfoenolpyruvátu (PEP) s D-erytroso-4-fosfátem přes meziprodukt na první cyklickou sloučeninu – kyselinu 3-dehydrochinovou. Ta dehydratací a několika redukčními reakcemi přes mezikrok kyselinu 3-dehydrošikimovou vytvoří kyselinu šikimovou. Od kyseliny šikimové se přímo odvozují kyselina gallová a pyrokatechová jako základní sloučeniny mnoha přírodních produktů (např. tanniny). Fosforylací kyseliny šikimové vzniká kyselina chorismová a přes kyselinu prefenovou vzniká první esenciální aminokyselina – L-fenylalanin. Produkty paralelních reakcí jsou L-tyrosin, L-tryptofan a kyselina anthranilová, základní stavební kameny mnoha známých sloučenin jako kyselina salicylová, kyselina listová, dopamin a katecholaminy, kumariny a alkaloidy. Deaminací L-fenylalaninu enzymem PAL (phenylalanineammonia lyase) vzniká kyselina skořicová, která je přeměněna na kyselinu p-kumarovou (hydroxyskořicovou) a ta je po přijetí koenzymu A schopna reagovat se třemi molekulami malonyl-CoA vzniklých acetátovou biosyntetickou cestou. Tím vznikne polyketidická sloučenina, která se podle podmínek prostředí přemění enzymem chalkonsyntázou buď na naringenin nebo liquiritigenin, dvě sloučeniny určující strukturu flavonoidů. Z těchto dvou flavanonů vznikají flavony, dihydroflavonoly a z nich dále flavandioly, katechiny, anthokyanidiny, leukoanthokyanidiny a ostatní deriváty.^(1,44)

Schéma biosyntézy flavonoidů:





3.3 Rostlinné kultury *in-vitro*

3.3.1. Explantátové kultury rostlin

Explantátové kultury rostlin jsou kultury izolovaných částí rostliny, které se získávají jejich oddělením ze sterilně napěstovaných nebo povrchově sterilizovaných rostlin. Tyto části se umístí do sterilního prostředí a kultivují *in vitro* za specifických podmínek neomezeně dlouhou dobu. Pro odvození explantátové kultury je teoreticky vhodné jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem, výjimku tvoří jen některé velmi specializované buňky jako sklereidy, sítkovice, tracheidy. Tato vlastnost vychází z totipotence rostlinné buňky tj. schopnosti obnovit v průběhu diferenciacních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertilní rostlinu.⁽⁴⁵⁾

Rozdělení explantátových kultur:

- kultury orgánové – diferencované orgány nebo jejich části pěstované způsobem, který zachovává jejich stavbu a funkci, např. kořenové kultury
- kultury tkáňové – mnohobuněčné komplexy pletiva do určitého stupně soudržné, kultivované většinou na polotuhých nebo pevných nosičích nasycených živným médiem
- kultury suspenzní – suspenze volných buněk a malých buněčných shluků v tekutém médiu, promíchávané a provzdušňované
- kultury buněčné – jednotlivé volné buňky pomnožované v tekutém nebo polotekutém médiu nebo na pevném nosiči nasyceným médiem
- kultury protoplastů – buňky zbavené buněčné membrány (většinou enzymaticky) obklopené pouze cytoplazmatickou membránou
- prašниковé kultury a kultury mikrospor – izolované prašníky pěstované v tekutém médiu nebo na pevném nosiči
- kalusové kultury – kultury pletiv prolifерující na povrchu primárních explantátů schopné subkultivace (pasážování)⁽²⁾

Počátečním krokem kultivace je výběr vhodné matečné rostliny s vysokou produkcí metabolitu požadovaného od kultury. Fragment některého orgánu

sterilní rostliny se umístí *in vitro* na vhodné sterilní agarové médium. V této fázi je důležité komplexní složení živného média. Po několika týdnech se objeví primární kalus, schopný rozmnožování na novém médiu. Po odstranění zbytku výchozího orgánu je na vhodném médiu schopen neomezeně proliferovat za podmínky pravidelného pasážování. Po větším počtu pasáží se získá stabilní a homogenní rostlinný materiál, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace (složení živné půdy, teplota, osvětlení a pravidelnost pasáží). Suspenzní kulturu lze z tkáně pěstované na pevném médiu získat buď enzymovým rozvolněním nebo mechanickou cestou. ⁽²⁾

3.3.2. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů

Hlavním důvodem založení explantátové kultury je produkce sekundárních metabolitů a jejich možná izolace za takových podmínek a v takovém množství, aby celkový ekonomický výnos kultury byl větší než u volně rostoucích rostlin. Proto se biotechnologické postupy zdokonalují ve snaze získat z určité kultury nejvyšší možné výnosy. Podle již zmíněné totipotence je sice možné pro založení kultury použít jakoukoliv část rostliny, ve skutečnosti jsou ale podmínky vhodnosti určité rostliny nebo její části pro tvorbu explantátové kultury určeny druhem rostliny (jednoděložné rostliny mají ve srovnání s dvouděložnými nižší schopnost tvorby kalusu, kalusy dřevin rostou mnohem pomaleji) a produkce sekundárních metabolitů je ovlivněna stářím kultury, stupněm diferenciací buněk a obdobím kultivační periody. ^(2,45)

Nejpoužívanější metody pro ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách jsou: ovlivnění kultivačních podmínek, přidání prekurzorů do živného média, biotransformace, elicítace, imobilizace a genetické manipulace s rostlinným materiálem.

Kultivační podmínky

Základní podmínkou pěstování explantátových kultur je použití vhodného živného média. Pro jednotlivé rostlinné druhy se často složení média liší, ale bylo vypracováno několik základních druhů živných médií, např. médium podle Murashigeho a Skooga (tzv. MS médium), médium podle Gamborga (B5),

médium podle Schenka a Hildebrandta (SH), vhodných pro většinu explantátových kultur. Základními složkami živného média jsou:

- voda
- zdroj uhlíku (většinou cukr, nejčastěji sacharóza, ale i glukóza nebo fruktóza, někdy organická kyselina)
- zdroj dusíku (nitráty, amonné soli nebo aminokyseliny – L-glutamin, L-asparagin)
- ostatní makroelementy (fosfor, draslík, vápník, hořčík, síra)
- mikroelementy (železo, mangan, měď, zinek, bor, molybden a další)
- vitamíny (některé kultury jsou schopné syntetizovat vitamíny, ale nikde ne v optimálním množství postačujícím pro růst kultury, nejdůležitější je skupina vitamínu B – pyridoxin, thiamin, kyselina nikotinová, biotin a myoinositol)
- nedefinované směsi přírodních látek (hydrolyzát kaseinu, kokosové mléko, extrakt z banánů, sladový extrakt a jiné)
- stimulatory růstu – fytohormony (kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová, kyselina β -indolyloctová (IAA), kyselina α -naftolyloctová (NAA), kyselina abscisová a další)
- látky pro zpevnění média (agar), dále je možno kulturu pěstovat na můstcích z filtračního papíru, na plovoucích polopropustných membránách nebo na polyuretanové pěně^(2,29)

K základním fyzikálním faktorům působícím na rostlinné explantáty patří intenzita světla, teplota, pH živného média, sterilita kultivačního prostředí.

V závislosti na intenzitě světla dochází často v intaktních rostlinách i tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů. Světlo může být stimulujícím faktorem, ale existují i skupiny látek, jejichž produkci světlo inhibuje. Může také záležet na části rostliny, ze které byla kultura odvozena.

Teplota kultivace se většinou pohybuje mezi 17-25 °C.

Optimální hodnota pH živného média je obvykle mezi 5,0 – 6,0, ale je závislá na typu kultury. Úprava se provádí přísadou NaOH nebo HCl a lze tak docílit

zvýšené stability některých metabolitů nebo zlepšit jejich vylučování do média a tím usnadnit pozdější izolaci.

Sterilita prostředí, rostlinného materiálu a živného média je důležitá v předcházení kontaminace kultury plísněmi a bakteriemi, kterým médium může vytvářet příznivé podmínky pro růst.

V moderních bioreaktorech je možné ovlivňovat též množství O₂, CO₂ a jiných plynů, včetně způsobu jakým se do kultivační nádoby dostávají (přestupem přes membránu, nebo probubláváním), dá se též optimalizovat tvar míchadel a rychlost míchání. ^(2,29,45)

Přidání prekurzoru

Jednou z možností stimulace tvorby sekundárních metabolitů je přidání prekurzoru do živného média. Tato metoda je výhodná pouze v případě, že prekurzor je mnohem levnější než produkt a má požadované vlastnosti, hlavně schopnost dostat se z média do organely, ve které probíhá příslušná metabolická přeměna. Metoda přidání prekurzoru je známá od šedesátých let minulého století, kdy se začala používat při přeměně aminokyselin na tropanové a indolové alkaloidy. Dnes se používá například na zvýšení produkce kyseliny rozmarýnové suspenzní kulturou *Salvia officinalis*. ^(46,47)

Biotransformace

Biotransformace může být realizována kulturou, která v níž je celá biosyntetická sekvence určité látky porušena, ale enzym schopný zprostředkovat danou reakci je tvořen v dostatečném množství. K rostlinnému materiálu je přidán exogenní substrát, který je rostlinnou buňkou nebo orgánem přijat, zapojen do metabolických procesů a působením rostlinných enzymů přeměněn na výsledný produkt. Tato biosyntetická cesta se jeví výhodná pro stereo- a regio-spezifické reakce, u kterých je běžné chemické provedení finančně náročné. Byli již popsány epoxidace, izomerizace, tvorba esterů a jejich zmýdelnění ⁽²⁾, glukosylace ⁽⁴⁸⁾, hydroxylace ⁽⁴⁹⁾ i redukce dvojných vazeb ⁽⁵⁰⁾ a nitroskupin. ⁽⁵¹⁾

Elicitace

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Možným nežádoucím vlivům se brání různými způsoby, morfologickou adaptací (ostny, trny), schopností rychlé regenerace nebo biochemickou adaptací (produkce sekundárních metabolitů, které působí odpudivě až toxicky na škůdce). Některé sekundární metabolity jsou v těle rostlin produkovány v malém množství neustále, i když nejsou ohrožovány škůdcem (např. alkaloidy, tanniny, kyanogenní glykosidy). Specifickou skupinu látek tvoří nízkomolekulární látky produkované sekundárním metabolizmem (fytoalexiny, fytoncidy, fytoanticipiny) jejichž produkce a akumulace v rostlině je indukována patogenem. Tvorba těchto látek byla sledována po napadení rostliny virem, bakteriemi, houbami, nematody, hmyzem a na základě toho byli objeveny fytoalexiny působící antibakteriálně, fungostaticky, nematostaticky. Ve zdravé rostlině se tyto látky nevyskytují, případně jen v minimálním množství. Řadíme sem např. flavonoidy, izoflavonoidy, steroidy, terpeny, stilbeny, polyacetyleny, přičemž jde o látky druhově specifické. ^(52,53)

Počátkem všech obranných reakcí je signál pro jejich spuštění – elicitor. Tato látka se uvolní po kontaktu buňky se škůdcem a je rozpoznána a navázána na membránový receptor rostlinné buňky. Po této aktivaci receptoru dojde k intracelulárnímu přenosu signálu pomocí systému přenašečů (jde o tzv. second messengers – systém cAMP, fosfoinositolový systém, systém tvorby reaktivních forem kyslíku, tvorby ethylenu a další zatím nedostatečně prozkoumané systémy). Následně dojde k aktivaci specifických genových systémů nutných k produkci stresových proteinů a odpovědi sekundárního metabolizmu. Vlastní obranná reakce teda spočívá ve změně metabolizmu buňky. ^(52,54,55)

Elicitory dělíme podle jejich původu na abiotické a biotické. Mezi abiotické řadíme fyzikální faktory (jako je změna pH, teploty a osmotického tlaku, UV záření) a chemické faktory (jako těžké kovy a jejich soli – HgCl₂, CuSO₄, detergenty, pesticidy, antibiotika). Biotickými elicitory jsou viry, bakterie, houby, kvasinky, mykoplazmata a organické molekuly pocházející z těchto organismů (např. fragmenty buněčných stěn – oligomery chitinu z hub nebo oligogalakturany). ⁽⁵²⁾

Imobilizace

Imobilizace buněk na povrchu polymerové matrice, popřípadě přímo v ní, má často za výsledek zvýšení produkce sekundárních metabolitů v porovnání se suspenzními kulturami. Imobilizace se děje ukotvením rostlinných buněk na povrchu nosiče (nosič může mít podobu částic, sítě nebo pěny), zachycením uvnitř gelových částic nebo například obalením buněk membránovou strukturou. Imobilizace buněk ještě není v rostlinné biotechnologii tak využívána jako v biotechnologii mikrobiální, ale ukazuje se, že i zde má mnohé výhody (delší životnost buněk kultury, prodloužení kultivační periody, znemožnění přílišného nárůstu viskozity a s tím související ulehčení míchání a provzdušňování.). Jestliže je produkt uvolňován do média, zjednoduší se následné izolační procesy. Imobilizace přináší však i řadu nevýhod, díky kterým není zatím u rostlinných kultur běžně využívána (extracelulární degradace produktu, ukotvení buněk vytváří další bariéry pro difúzi, imobilizace limituje růst kultur atd.).^(2,56)

Genetická manipulace

Genetické manipulace spočívají v izolaci genetického materiálu, jeho následné úpravě a transferu zpět do organismu nebo do buněčných kultur. V případě zvýšení produkce sekundárních metabolitů u rostlin jsou používány dvě základní metody. První mění expresi jednoho nebo několika genů kódujících klíčové kroky biosyntézy, nebo těch, které zastavují kompetitivní metabolické cesty, popřípadě snižují katabolismus produktů. Druhá metoda je zaměřena na změnu exprese regulatorních genů, které kontrolují geny příslušné biosyntetické cesty.⁽²⁹⁾

3.4 Transportní mechanismy flavonoidů

Sekundární metabolity produkované rostlinou jako reakce na různé stresové faktory mohou být pro buňku potenciálně toxické, a proto se ukládají ve vakuolách. Vakuoly často zabírají až 90% z objemu rostlinné buňky a slouží převážně jako skladovací prostory.⁽⁶⁴⁾ Mechanizmy, kterými se různé chemické látky dostanou do vakuoly jsou již nějakou dobu předmětem zkoumání. Předpokládají se tyto mechanismy:

- transport vody pomocí „aquaporů“ TIPs (tonoplast-intrinsic proteins), které mohou navíc v některých případech transportovat i malé molekuly jako močovinu a glycerol⁽⁶²⁾
- vakuolární H⁺-ATPáza a H⁺-PPáza (H⁺- pyrofosfatáza), které fungují jako protonové pumpy tvořící elektrochemický gradient použitelný dalšími transportéry^(62,64)
- ABC transportéry (ATP binding cassette), které využívají energii z ATP, jsou proto citlivé k inhibitorům ATPáz (např. vanadát), ale nezávislé na membránovém potenciálu a pH gradientu^(63,64)
- další transportní systémy ve vakuolární membráně přenášející ionty nezbytné pro rostliny jako Ca²⁺ a Na⁺, které fungují jako protonové antiporty (Ca²⁺/H⁺, Na⁺/H⁺)⁽⁶²⁾

Nejdůležitější roli v přenosu sekundárních metabolitů do vakuol mají ABC transportéry. Je to početná a velmi rozdílná skupina proteinů, které se vyskytují nejen v rostlinách, jsou zastoupeny také v mikroorganismech a v savčích buňkách. V posledních letech bylo objeveno mnoho rostlinných ABC transportérů, některé hrají roli i při přenosu signálu a živin v interakcích rostlina-mikroorganismus např. symbiotické soužití rodu *Rhizobium* a kořinek rostlin za účelem fixace dusíku. Kromě funkce transportních pump ABC transportéry pozměňují aktivitu iontových kanálů a také je regulují. Jsou součástí velké rodiny proteinů zvaných MRP (multidrug resistance-associated proteins), které jsou schopny přenášet peptidy, lipidy, cukry, cheláty těžkých kovů, steroidy a glutathionové konjugáty.⁽⁶³⁾ Některé ABC transportéry jsou relativně specifické pro určité substráty, ale většina může přenášet několik různých substrátů. Tyto

přenašeče se nacházejí ve vakuolárních membránách všech rostlin bez ohledu na to, jestli je rostlina schopna tvořit sekundární metabolity, které by těmto přenašečům mohli sloužit jako substráty.⁽⁶⁴⁾

I některé flavonoidy jsou pravděpodobně přenášeny pomocí ABC transportérů. Záleží zřejmě též na jejich cukerné složce. Zejména glukuronidy a také negativně nabitě konjugáty s glutathionem jsou vhodným substrátem pro přenos pomocí ABC transportérů.^(63,64)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie a přístroje

4.1.1. Chemikálie

- methanol pro HPLC, glutathion-reduced form: Fluka, Buchs;
- peroxid vodíku: Penta Chrudim;
- baicalin č., baicalein č., sodium orthovanadate puriss.: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim;
- kyselina α -naftyloctová č., myoinositol puriss.: Sigma, St. Luis;
- chlorid thiaminia puriss., chlorid pyridoxinia puriss.: Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook Hampshire;
- enzymatický hydrolyzát kaseinu: Imuna, Šarišské Michalany;
- dihydrofosforečnan draselný č., dusičnan draselný p.a., dusičnan amonný p.a., glycin č., hydrogenfosforečnan sodný p.a., chlorid kobalnatý p.a., chlorid vápenatý p.a., jodid draselný p.a., kyanid draselný č., kyselina boritá p.a., kyselina o-fosforečná č., kyselina nikotinová č., methanol p.a., molybdenan sodný p.a., petrolether p.a., sacharosa p.a., síran hořečnatý p.a., síran manganatý p.a., síran měďnatý p.a., síran zinečnatý p.a., síran železnatý p.a.: Lachema, Brno.

4.1.2. Přístroje a chromatografické doplňky

- autokláv PS 121, horkovzdušný sterilizátor HS 81A, Chirana, Brno;
- analytické váhy A 200S: Sartorius, Göttingen;
- vakuová rotační odparka LABOROTA 4002, Heidolph, Schwabach;
- box s laminárním prouděním Fatran L-F: výrobné družstvo Pokrok, Žilina;
- vodní lázeň KL: Laboratorní přístroje, Praha
- HPLC chromatograf JASCO (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055): Jasco International, Tokyo;

- chromatografické kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m) s předkolonkou: Merck, Darmstadt;
- třepačka CEROMAT MO: B. Braun Biotech. International, Melsungen.

4. 2. Kultivace a pasážování suspenzních kultur *S. baicalensis*

Suspenzní kultury byly odvozeny z 9. pasáže kalusových kultur připravených z částí kořenů vyklíčených rostlinek na katedře farmakognozie. Jejich kultivace probíhala v 250 ml kulatých baňkách s plochým dnem na rotační třepačce, při 120 otáčkách za minutu..

Živné médium

Suspenzní kultury šišáku bajkalského byly kultivovány v tekutém médiu podle Murashigeho a Skooga, jehož složení je následující:

CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00 mg.l ⁻¹
KNO ₃	1900,00 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00 mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,00 mg.l ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,84 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,37 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,20 mg.l ⁻¹
KI	0,83 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
inositol	100,00 mg.l ⁻¹
hydrolyzát kaseinu	1000,00 mg.l ⁻¹

glycin	2,00 mg.l ⁻¹
kyselina nikotinová	0,50 mg.l ⁻¹
thiamin hydrochlorid	0,10 mg.l ⁻¹
pyridoxin hydrochlorid	0,50 mg.l ⁻¹
sacharóza	30000,00 mg.l ⁻¹

Tato množství byla odvážena na analytických vahách, látky potřebné v malém množství byly odpipetovány ze zásobních roztoků. Jako růstový stimulant byla používána NAA v koncentraci 10 mg.l⁻¹.

Živné médium bylo rozplněno do 250 ml kulatých baněk s plochým dnem, a to po 50 ml. Baňky byly překryty hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu (15 min, 120°C).

Pasážování

Vlastní pasážování spočívalo v přenesení asi 10 ml vzrostlé suspenzní kultury na čerstvé médium pomocí pipety. Pipety byly předem po vložení chomáčku vaty a obalení hliníkovou fólií sterilizovány v autoklávu (15 min, 120°C).

Kultivační perioda byla 12-14 dní.

Kultivace probíhala v kultivační místnosti při 25°C v 16ti hodinové světelné periodě.

4. 3. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu

4. 3. 1. Příprava vzorků

Suspenzní kultury byly nejprve pečlivě přefiltrovány a promyty vodou, poté předsušeny na filtračním papíře při laboratorní teplotě po dobu asi 24h a dosušeny v sušárně při 50°C.

Sušný materiál byl posléze rozdrobněn pomocí třenky a těrky a extrahován: vzorek 0,200 g rostlinného materiálu byl dvakrát extrahován 10 ml 80 % methanolu na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 30 min. Objem byl po extrakci doplněn na 20 ml 80 % methanolem. Chlorofyl a lipidy byly odstraněny

několikanásobným třepáním s petroléterem. Poté byly vzorky zfiltrány přes tetlonový mikrofiltr (0,45 μm) a připraveny k HPLC analýze.

Pro stanovení baicalinu a baicaleinu v živném médium bylo vzhledem k malým obsahům těchto látek nutno nejdříve redukovat větší objem média (100 ml) na méně než 5 ml pomocí rotační vakuové odparky. K tomuto zbytkovému množství bylo přidáno 15 ml 80 % methanolu a po dokonalém promísání byl objem doplněn methanolem na 20 ml. Vzorek byl poté zfiltrován mikrofiltrem (0,45 μm).

4. 3. 2. HPLC analýza

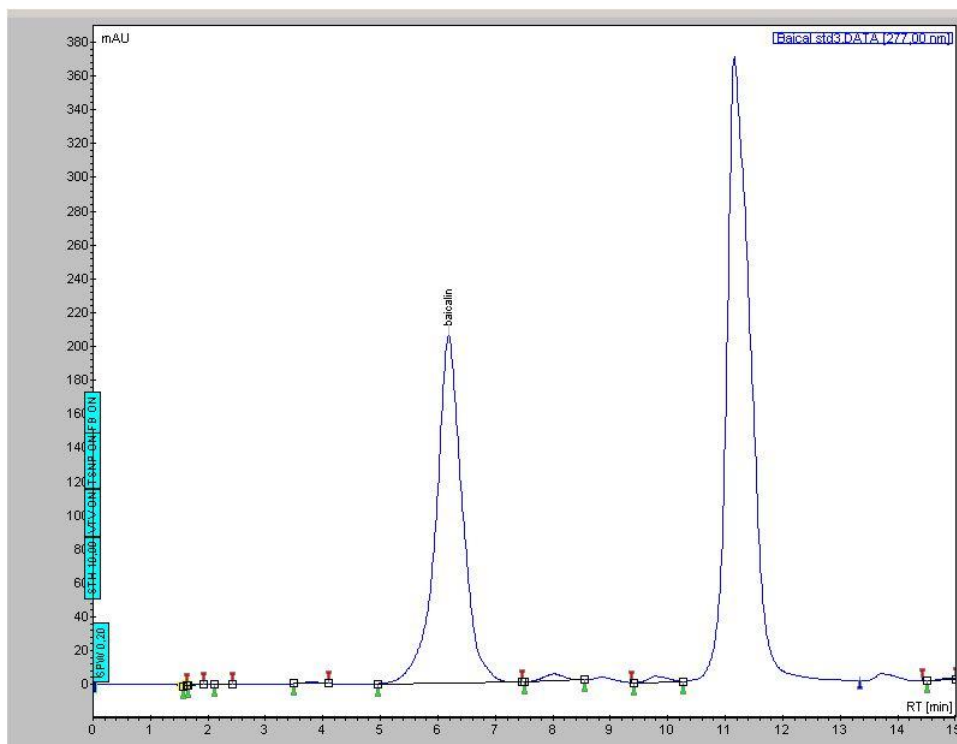
HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055).

Sestava byla vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 μm) s ochrannou předkolonkou.

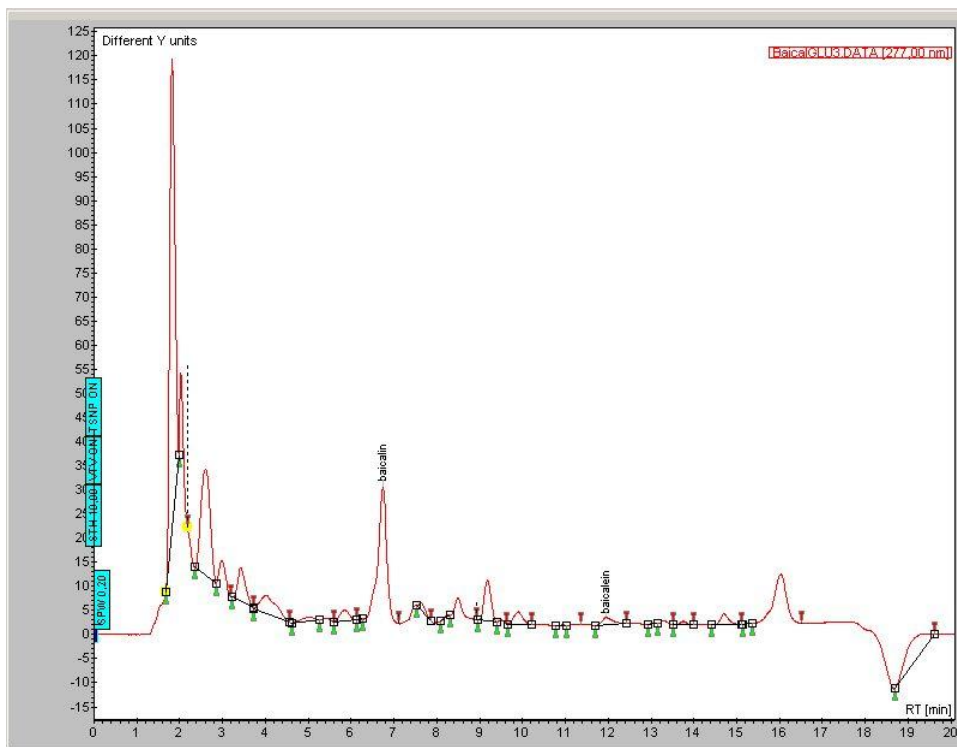
Nastříkovaný objem byl 20 μl . Složení mobilní fáze probíhalo v lineárním gradientu z 50 % methanolu s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné (pH = 2,9) v čase $t = 0$ min na 75 % methanol (s 0,15 % kyseliny fosforečné) v čase $t = 15$ min, při konstantním průtoku mobilní fáze 1,2 ml.min⁻¹.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190 - 450 nm. Obsah sledovaných flavonoidů byl vypočten z píků při vlnové délce 277 nm, ve které mají oba flavonoidy své absorpční maximum. Retenční časy u baicalinu byly cca 6 min. 33 sec., u baicaleinu cca 11 min. 30 sec. Obsah obou látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Ukázka chromatogramu – standard



Ukázka chromatogramu – vzorek



4. 3. 3. Validace HPLC analýzy

Validace znamená ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody).

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco) a to normou ISO 9001 (International Organization for Standardization).

Způsobilost chromatografických systémů byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku – tzv. test na přesnost (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearit (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r , která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 3. vydání : Asymetrie píku a Počet teoretických pater.⁽⁵⁷⁾

Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry:

- správnost metody - jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem)^(58,59)
- kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %)^(58,59)

4.4 Vliv vybraných elicitorů na produkci sekundárních metabolitů

4.4.1. Sledování vlivu glutathionu

K suspenzním kulturám byla na konci jejich kultivační periody přidávána redukováná forma glutathionu. Přidávání probíhalo vždy po 1 ml ze sterilních zásobních roztoků tak, aby konečná koncentrace v médiu byla 1, 10 a 100 mg.l⁻¹. Ke kulturám sloužícím jako kontrola byl přidán 1 ml sterilní vody.

Po 5, 24 a 72 hodinách kultivace byly odebrány vzorky kultur a po usušení a extrakci byl metodou HPLC stanoven obsah baicalinu a baicaleinu ve vzorcích.

Po 72 hodinách kultivace došlo ke změně zbarvení tekutého média a podle předpokladu, že by se sekundární metabolity mohly vyloučit z buněk do média bylo tekuté médium také analyzováno metodou HPLC.

4.4.2. Sledování vlivu kyanidu draselného bez a v přítomnosti peroxidu vodíku

K suspenzním kulturám byl na konci jejich kultivační periody přidáván kyanid draselný a kyanid draselný spolu s peroxidem vodíku. Tyto elicitory byli přidávány vždy po 1 ml ze sterilních zásobních roztoků tak, aby konečná koncentrace peroxidu vodíku v médiu byla $13,6 \text{ mg.l}^{-1}$ (4 mM na 1 gram živých buněk – odvozeno z práce Morimota)⁽⁷³⁾ a koncentrace kyanidu draselného byla 65 mg.l^{-1} (1 mM.l^{-1}).⁽⁷⁴⁾ Ke kontrolním kulturám byl přidán 1 ml sterilní vody.

Po 30, 60, 180 a 300 minutách kultivace byly odebrány vzorky kultur a metodou HPLC bylo stanoveno množství baicalinu a baicaleinu ve vzorcích.

4.4.3. Sledování vlivu orthovanadátu

K suspenzním kulturám byl na konci jejich kultivační periody přidáván orthovanadát sodný. Přidávání probíhalo vždy po 1 ml ze sterilních zásobních roztoků tak, aby konečná koncentrace v médiu byla 1, 10 a 100 mg.l^{-1} . Ke kulturám sloužícím jako kontrola byl přidán 1 ml sterilní vody.

Po 3, 5 a 24 hodinách kultivace byly odebrány vzorky kultur a metodou HPLC stanoven obsah baicalinu a baicaleinu.

4.5. Statistické zpracování výsledků

Statistická významnost naměřených výsledků byla vypočítána pomocí t-testu rozdílu dvou průměrů podle následujících matematických vztahů:

$$\text{Aritmetický průměr: } x = \frac{\sum_{i=1}^a x_i}{a}$$

$$\text{Směrodatná odchylka: } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^a (x - x_i)^2}{a - 1}}$$

x_i = naměřené hodnoty,

x = aritmetický průměr,

a = rozsah souboru

Pro výpočet testovacího kritéria platí následující vztah:

$$\text{Testovací kritérium: } t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{a_1 \cdot s_1^2 + a_2 \cdot s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{a_1 a_2 (a_1 + a_2 - 2)}{a_1 + a_2}}$$

x_1 = aritmetický průměr kontrolního souboru,

x_2 = aritmetický průměr pokusného souboru,

s_1 = směrodatná odchylka kontrolního souboru,

s_2 = směrodatná odchylka pokusného souboru,

a_1 = počet členů kontrolního souboru,

a_2 = počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočteným podle vzorce: $v = a_1 + a_2 - 2$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou tabulkovou kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočtený stupeň volnosti v a zvolenou hladinou významnosti p ($p = 0,05$). Je-li hodnota t větší než hodnota $t(v)_p$, je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti p .⁽⁶⁰⁾

5. VÝSLEDKY

Výsledky jsou shrnuty ve formě tabulek a grafů. Uvedené hodnoty jsou aritmetickým průměrem tří samostatných měření.

5.1. Vliv redukované formy glutathionu v různých koncentracích na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře

Tabulka č.1: Po 5 hodinách

koncentrace glutathionu	<u>baicalin (v %)</u>	<u>baicalein (v %)</u>
kontrola	0,33	0,17
1 mg/l	0,28	0,14
10 mg/l	0,24	0,12
100 mg/l	0,25	0,12

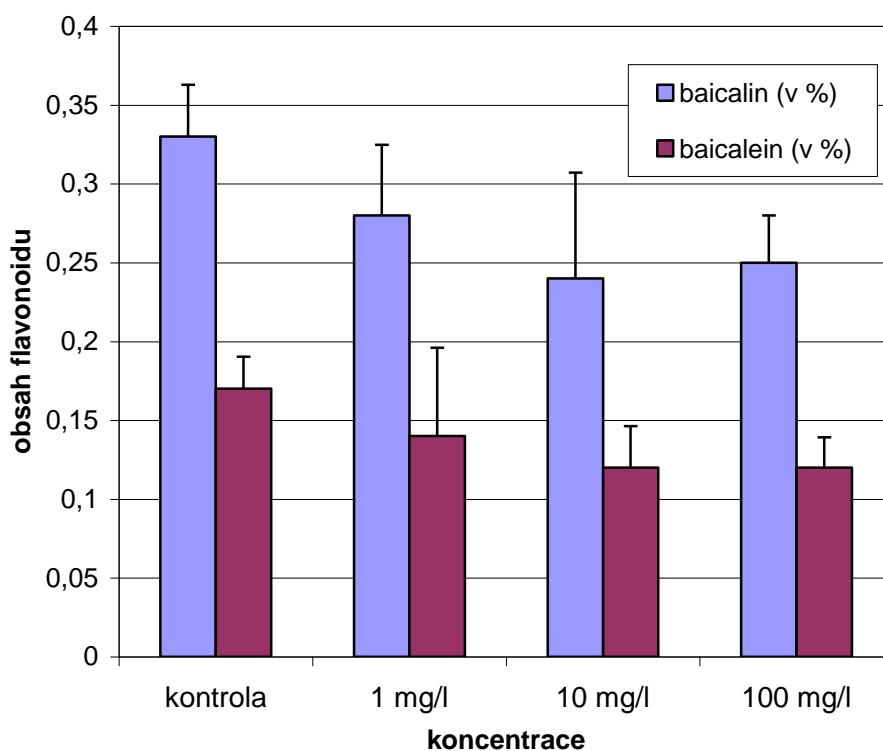
Tabulka č.2: Po 24 hodinách

koncentrace glutathionu	<u>baicalin (v %)</u>	<u>baicalein (v %)</u>
kontrola	0,16	0,16
1 mg/l	0,01	0,01
10 mg/l	0,01	0,01
100 mg/l	0,01	0,01

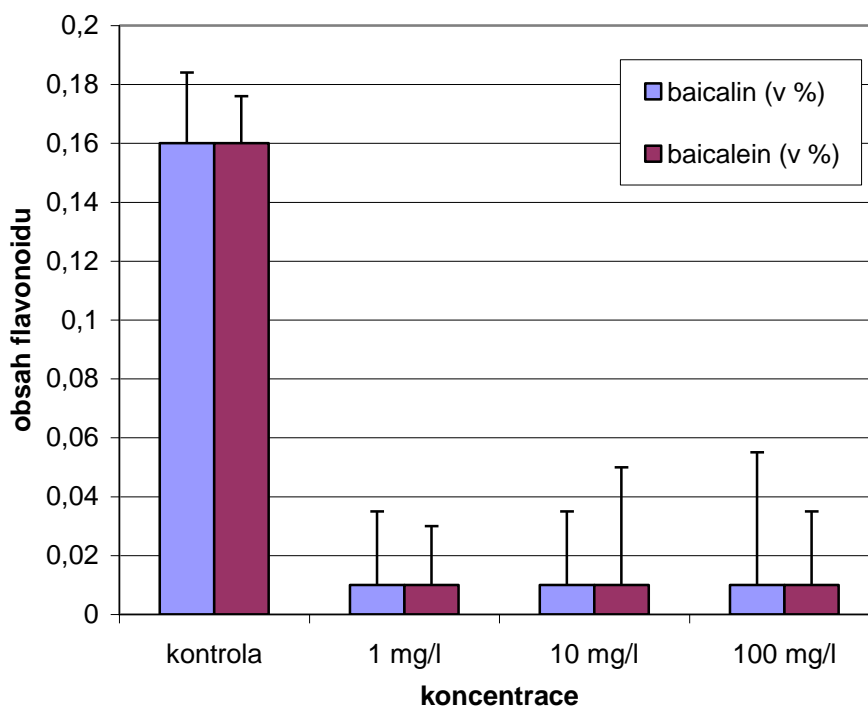
Tabulka č.3: Po 72 hodinách

koncentrace glutathionu	<u>baicalin (v %)</u>	<u>baicalein (v %)</u>
kontrola	0,04	0,02
1 mg/l	0,01	0,02
10 mg/l	0,01	0,03
100 mg/l	0,01	0,02

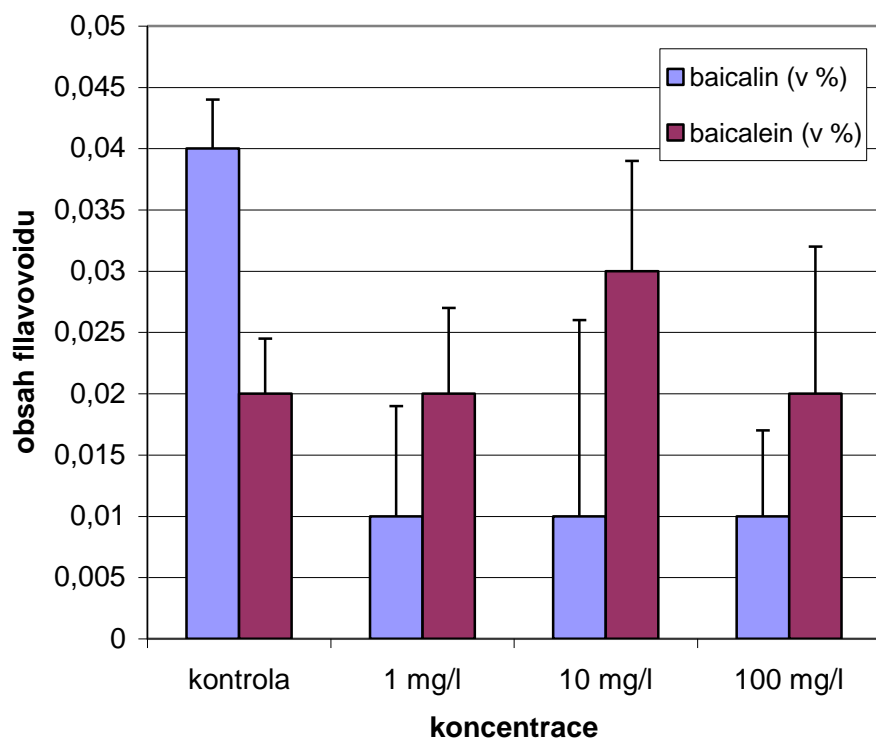
Graf č.1: Po 5 hodinách



Graf č.2: Po 24 hodinách



Graf č.3: Po 72 hodinách



5.2. Obsah flavonoidů v médiu po expozici suspenzní kultury různé koncentraci glutathionu

Tabulka č.4: Po 72 hodinách

koncentrace glutathionu	baicalin (v %)	baicalein (v %)
kontrola	0	0,01
1 mg/l	0	0
10 mg/l	0	0,03
100 mg/l	0	0

Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,01 %.

5.3. Vliv orthovanadátu na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře

Tabulka č. 5: Po 3 hodinách

	baicalin (v %)	baicalein (v %)
kontrola	0,25	0
1 mg/l	0,23	0,03
10 mg/l	0,33	0
100 mg/l	0,25	0

Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,005%.

Tabulka č.6: Po 5 hodinách

	baicalin (v %)	baicalein (v %)
Kontrola	0,28	0
1 mg/l	0,27	0
10 mg/l	0,22	0
100 mg/l	0,28	0

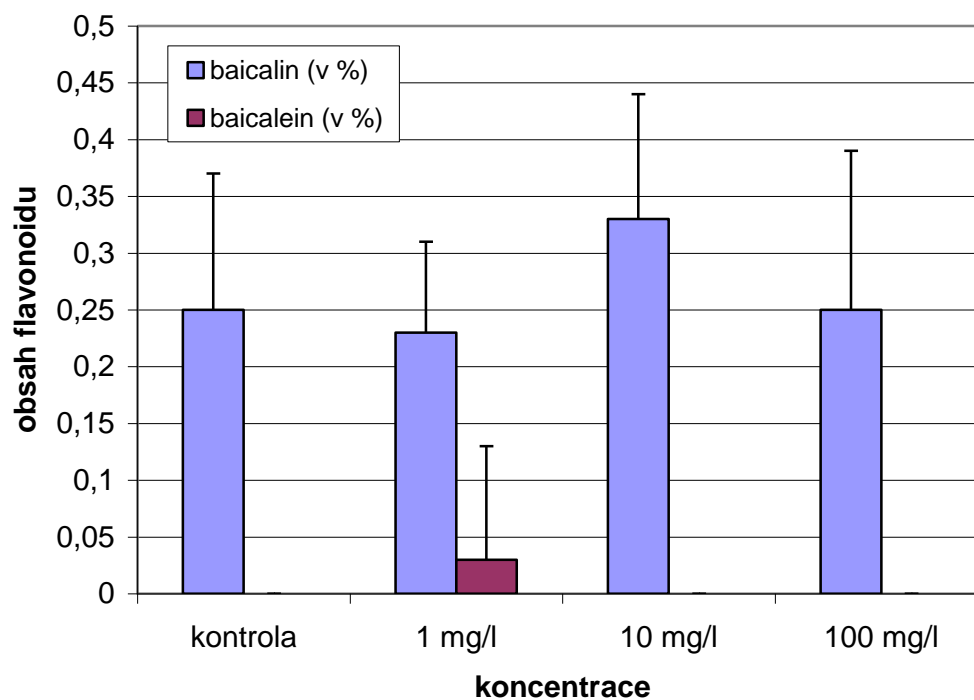
Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,005%.

Tabulka č.7: Po 24 hodinách

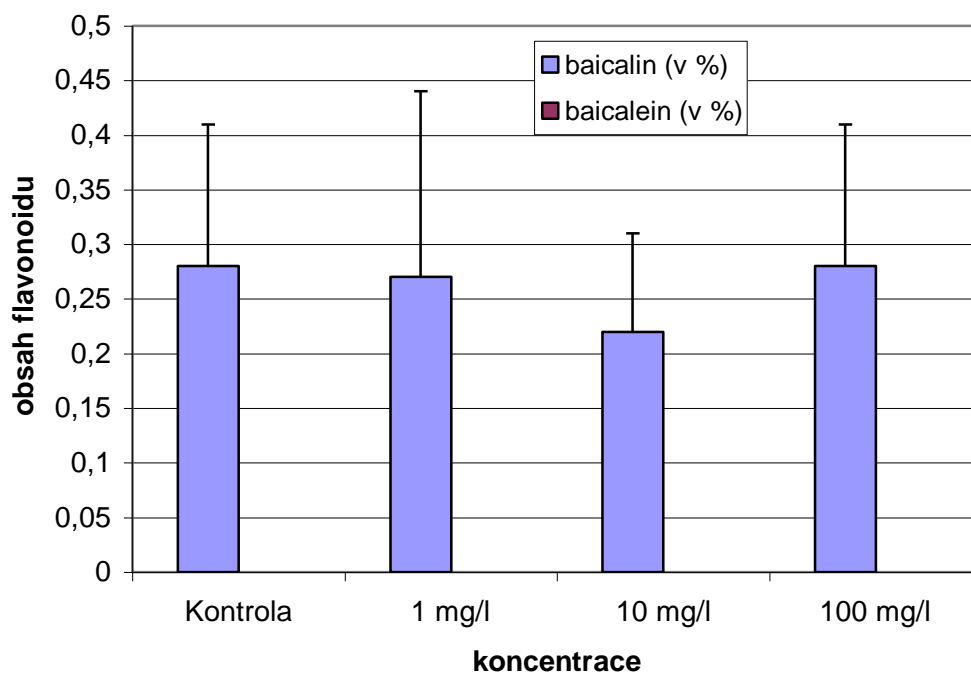
	baicalin (v %)	baicalein (v %)
Kontrola	0,23	0
1 mg/l	0,22	0
10 mg/l	0,20	0
100 mg/l	0,05	0

Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,005%.

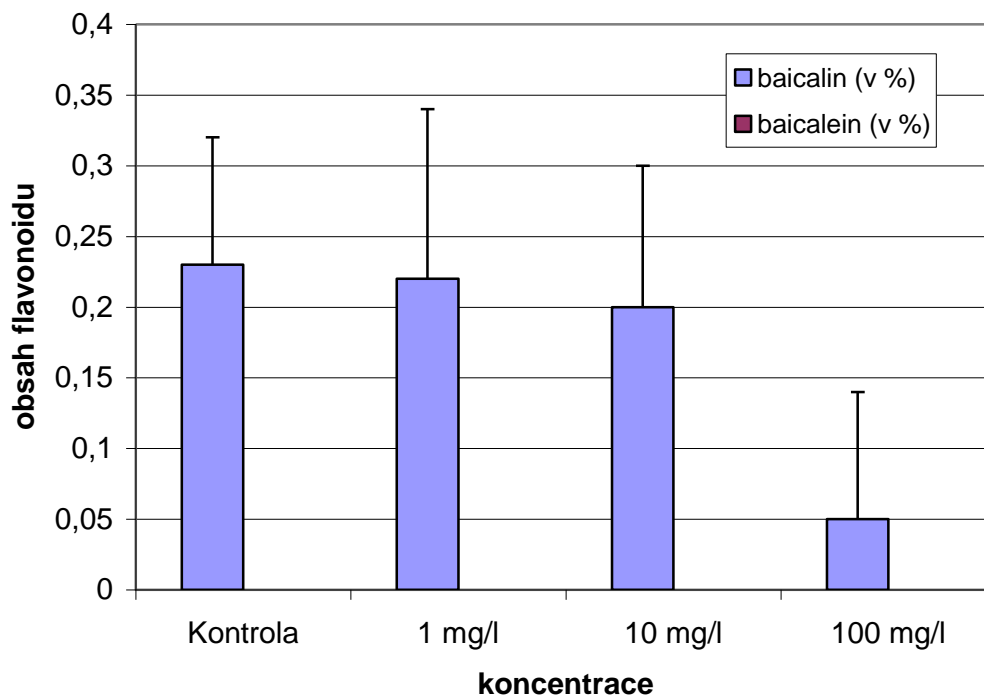
Graf č.4: Po 3 hodinách



Graf č.5: Po 5 hodinách



Graf č.6: Po 24 hodinách



5.4. Vliv kyanidu draselného za přítomnosti peroxidu vodíku na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře

Tabulka č.8: Po 30 minutách

	baicalin (v %)	baicalein (v %)
kontrola	0,03	0
KCN	0,04	0
KCN+H₂O₂	0	0

Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,005%.

Tabulka č. 9: Po 60 minutách

	baicalin (v %)	baicalein (v %)
kontrola	0,07	0
KCN	0,10	0
KCN+H₂O₂	0,05	0

Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,005%.

Tabulka č.10: Po 180 minutách

	baicalin (v %)	baicalein (v %)
kontrola	0,05	0
KCN	0,02	0
KCN+H₂O₂	0,09	0

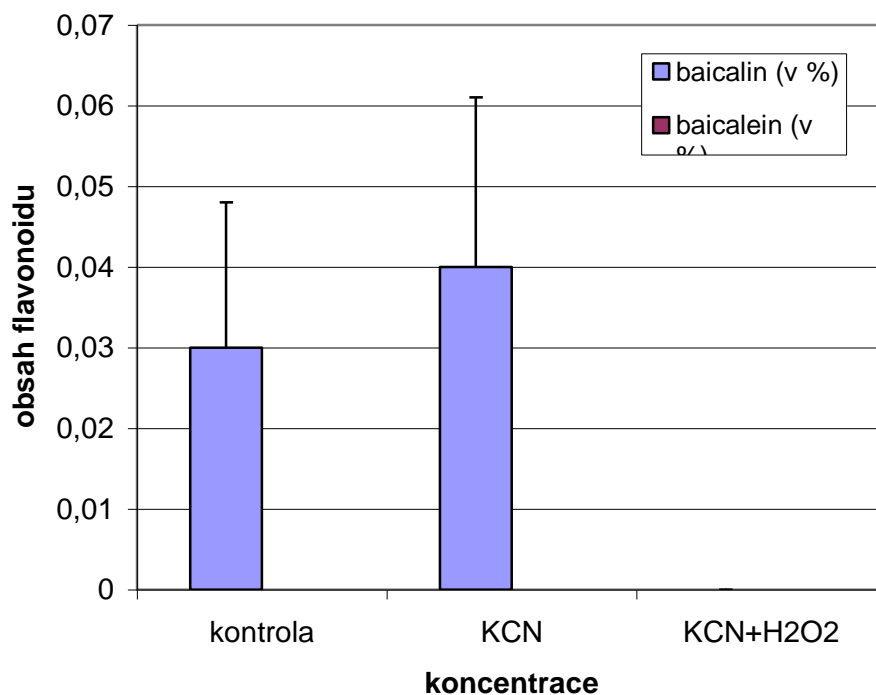
Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,005%.

Tabulka č.11: Po 300 minutách

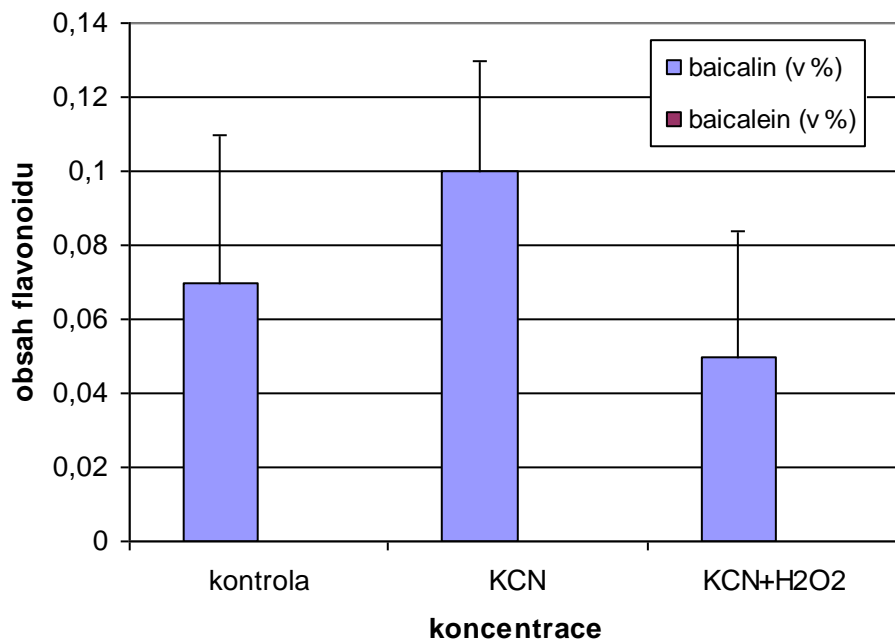
	baicalin (v %)	baicalein (v %)
kontrola	0,02	0
KCN	0,03	0
KCN+H₂O₂	0,02	0

Pozn.: Mez detekce zvolené metody byla 0,005%.

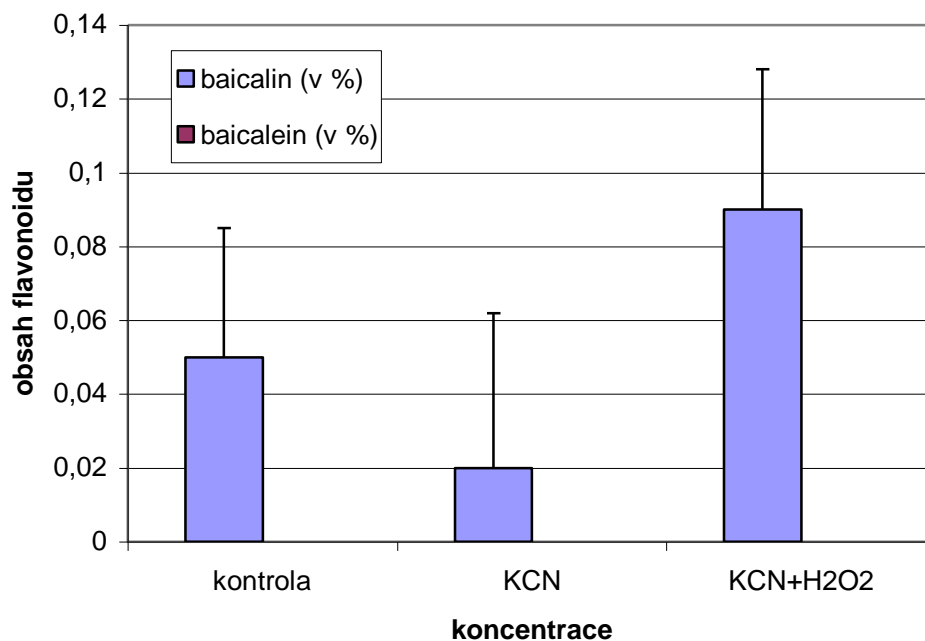
Graf č.7: Po 30 minutách



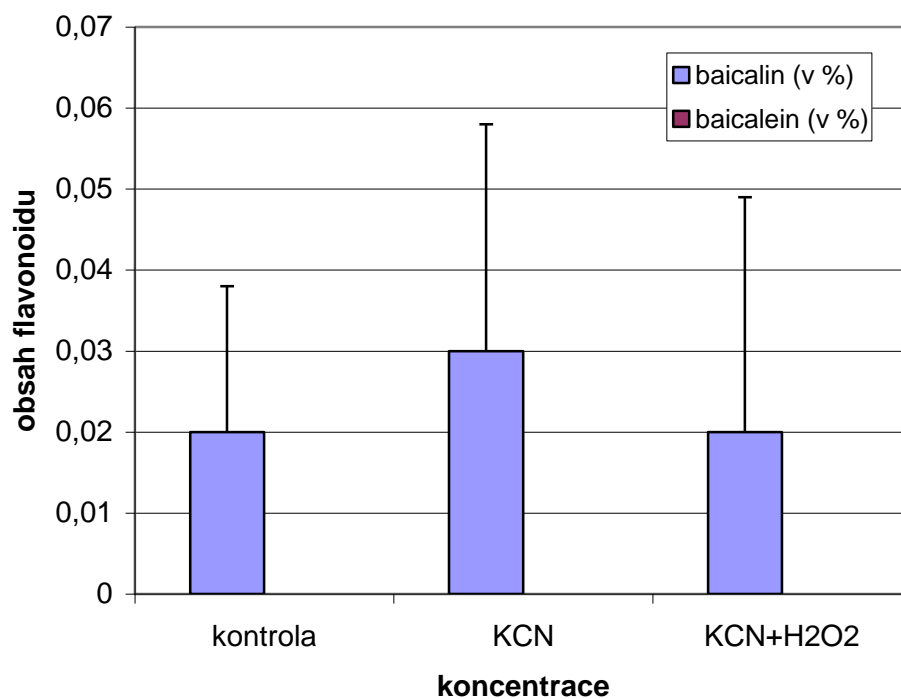
Graf č.8: Po 60 minutách



Graf č. 9: Po 180 minutách



Graf č. 10: Po 300 minutách



6. DISKUZE

Rostlinné vakuoly jsou morfologicky i funkčně velmi rozdílné. V buňkách rostlin se jich nachází různé množství a různé druhy podle stupně diferenciaci buňky. Protože jsou součástí endomembránového systému, mohou být prevakuolární komplexy nerozeznatelné od jiných buněčných organel. Největší pokroky ve zkoumání vakuol byli zaznamenány v souvislosti s vakuolární membránou – tonoplastem a transportem různých chemických látek přes tuto membránu.⁽⁶²⁾

Sledované flavonoidy pravděpodobně slouží v rostlinné buňce jako antioxidanty a podílí se na odstraňování oxidativního stresu. V systému baicalin/baicalein je zásobní a transportní formou baicalin, který je v čase potřeby uvolňován z vakuol a jeho cukerná složka je hydrolyzována. Vzniká baicalein, který je vlastním antioxidantem. Při odstraňování kyslíkatých radikálů je zřejmě oxidován pomocí peroxidáz na 6,7-dehydrobaicalein.⁽⁷³⁾

V této práci jsem se zaměřila na ABC transportéry flavonoidů, jejich souvislost s glutathionem, vanadátem a kyanidem draselným a ovlivněním obsahu flavonoidů v suspenzní kultuře.

Glutathion v redukované formě je často používán jako elicitor pro schopnost zvyšovat produkci fytoalexinů, zejména flavonoidů a isoflavonoidů v kultuře.^(67,68) Jsou známy případy, kdy glutathion v redukované formě neměl vliv na produkci sekundárních metabolitů, například studie o kumarínech.⁽⁷⁵⁾ U dalších studií naopak glutathion prokázal silný elicitální účinek.⁽⁶⁸⁾

Při sledování vlivu glutathionu na suspenzní kultury šišáku bajkalského jsem ale toto zvýšení produkce nezaznamenala. Došlo naopak k nevýznamnému snížení obsahu flavonoidů v kultuře po pětihodinové elicitaci (tabulka 1, graf 1) a významnému poklesu obsahu po 24-hodinové elicitaci (tabulka 2, graf 2).

Předpokládá se, že glutathion chrání rostlinnou buňku před oxidačním stresem a aktivuje její obranný systém.⁽⁶⁶⁾ Funguje tak jako další antioxidační systém paralelní k systému baicalin/baicalein. Proto může dojít v rostlině k zastavení produkce flavonoidů z důvodu nepřítomnosti oxidačního stresu, což je pravděpodobně i tento případ.

V předešlých pracích bylo zjištěno, že baicalin a baicalein nepřecházejí do živného média.⁽²⁹⁾ U kultur ovlivněných glutathionem se však po 72 hodinách projevila výrazná změna zbarvení média a podle žluté barvy jsem nabyla předpokladu, že by určité množství flavonoidů mohlo být přítomno v tomto médiu. Po HPLC analýze média byl tento předpoklad vyvrácen a zbarvení tak bylo způsobeno pravděpodobně přítomností jiné látky. (tabulka 4)

ABC transportéry jsou dotovány energií ze dvou ATPáz nacházejících se také na vakuolární membráně. Je také známo, že tyto ATPázy se dají snadno inhibovat přidáním látek jako je např. vanadát. Vanadát funguje jako fosfátový analog a inhibuje transport organických aniontů do vakuoly.^(69,70,71,72) Proto by přidání vanadátu do suspenzní kultury mělo způsobit i dramatický pokles obsahu glukuronidů – např. baicalinu.

V kultuře šišáku bajkalského byli po 3 a 5 hodinách pozorovány nevýznamné změny obsahu baicalinu a baicaleinu (tabulky 5 a 6, grafy 4 a 5), po 24 hodinách (tabulka 7, graf 6) však došlo k radikálnímu poklesu obsahu baicalinu při nejvyšší koncentraci vanadátu (100 mg/l). Z výsledků tedy vyplývá, že ATPáza u rostliny *Scutellaria baicalensis* je pravděpodobně vanadát-senzitivní, přesto by bylo potřebné provést několik dalších měření k ověření tohoto faktu. Navrhovala bych provést pokusy na izolovaných vakuolách nebo vyzkoušet kombinaci vanadátu s látkami způsobujícími oxidační stres.

Kyanid draselný řadíme k nekompetitivním inhibitorům peroxidáz. Po jeho přidání k suspenzním kulturám šišáku bajkalského by tedy mělo dojít k nárůstu obsahu baicaleinu, protože kyanid zabrání oxidaci baicaleinu na 6,7-dehydrobaicalein. Peroxid vodíku způsobuje rostlinným buňkám oxidační stres produkcí kyslíkových radikálů, přičemž působení je nejintenzivnější v prvních 10 minutách, pak se pomocí detoxikačních systémů rostliny množství peroxidu snižuje. Kombinace kyanidu draselného a peroxidu vodíku by tedy u kultur šišáku bajkalského měla přinést podstatné zvýšení obsahu baicaleinu, protože oxidační stres iniciuje biosyntézu baicalinu a baicaleinu, a zároveň bude znemožněna jejich následná degradace na oxidační produkty (6,7-dehydrobaicalein).

Při elicitaci suspenzní kultury šišáku bajkalského kyanidem draselným bylo výrazné změny zaznamenáno pouze v případě přidavku peroxidu vodíku po 30ti minutách, kdy došlo k poklesu obsahu baicalinu (tabulka 8, graf 7). Po 180 min

došlo naopak k jeho mírnému nárůstu (tabulka 10, graf 9). Výsledky tedy příliš neodpovídají výše zmíněné teorii.

Bohužel pasáž použitá k experimentům produkovala pouze baicalin a nikoli baicalein. Pro úplnou absenci tvorby baicaleinu při elicitaci kyanidem draselným by bylo vhodné pokusy zopakovat s kulturou produkující oba flavonoidy.

Z některých studií vyplývá, že použití kyanidu draselného jako inhibitoru peroxidáz může být problematické. Různé studie totiž dokázali, že kyanid draselný, spolu s dalším hojně používaným inhibitorem azidem sodným, spíše redukuje již přítomný peroxid vodíku. Nemusí tedy jít o inhibici peroxidázy, nýbrž pouze o redukci peroxidu vodíku vzniklého enzymem NADPH oxidáza. ⁽⁶⁵⁾

Vzhledem k prakticky neomezenému počtu elicitorů by bylo možné zkoumat jejich vliv na produkci flavonoidů u šišáku bajkalského i v budoucnu v rámci dalších diplomových, případně dizertačních prací.

7. ZÁVĚR

V průběhu této diplomové práce byla zvládnuta kultivace suspenzních kultur a experimentálně ověřen vliv některých elicitorů na tyto kultury. Dále byla zvládnuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), pomocí které byl stanoven obsah flavonoidů v kulturách.

Vlastním cílem této diplomové práce bylo poznat některé mechanismy transportu a biosyntézy baicalinu a baicaleinu v suspenzních kulturách šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis* GEORGII).

Glutathion, jehož přidání by podle některých studií mělo vést ke zvýšené produkci flavonoidů, měl negativní efekt na obsah baicalinu a baicaleinu v kulturách šišáku bajkalského. Zejména v čase 24 hodin a 72 hodin po přidání glutathionu došlo k výraznému snížení obou flavonoidů.

Elicitace vanadátem v koncentraci 100 mg/l po 24 hodinách způsobila výrazný pokles v produkci baicalinu. Z výsledků vyplývá, že ABC transportéry pro baicalin jsou pravděpodobně vanadát-senzitivní.

Kyanid draselný způsobil pouze mírné změny v obsahu sledovaných flavonoidů. Jeho použití jako elicitoru se nejeví jako optimální pro zatím nepříliš objasněný vliv na peroxidázy.

8. LITERATURA

- 1) Hubík J., Dušek J., Spilková J.: Farmakognosie I., SPN, Praha, 1989, s.8-17, s.33-34
- 2) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 1992, s.70-97
- 3) Ody, P.: Velký atlas léčivých rostlin, Osveta, Martin, 1998, s.14-17, 98
- 4) Valíček P. et al.: Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny, Svítání, Hradec Králové 1998, s. 244.
- 5) <http://www.jitrnizeme.cz/view.php?cisloclanku=2005061301>
- 6) Zhang Y. Y. et al.: Biomed. Chromatogr. 12, 31 (1998).
- 7) Duke J. A.: Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, internet: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl?915>.
- 8) Kazautaka N. et al.: Phytochemistry 52, 885 (1999).
- 9) Miyaichi Y., Tomimori T.: Nat. Med. 52, 82 (1998).
- 10) DiPaola R. S. et al.: New England J. Med. 339, 785 (1998).
- 11) Moyad M. A., Pienta K. J., Montie J. E.: Adult Urol. 54, 319 (1999); In: Geliebter J.: J. Nutrition 131, 164 (2001).
- 12) Okuda H.: Furi Rajikaru No Rinsho 10, 13 (1996); In: Chem. Abstr. 127, 314297 (1997).
- 13) Sekiya K., Okuda H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 1090 (1982).
- 14) Parmentier J. H. et al.: Hypertension 37, 623 (2001).
- 15) Kisch E. S. et al.: Hypertension 29, 796 (1997).
- 16) Takizava H., DelliPizzi A., Nasjletti A.: Hypertension 31, 866 (1998).
- 17) Wen Y. et al : Circulation Res. 88, 70 (2001).
- 18) Chang Y. L. et al.: Mol. Pharmacol. 60, 507 (2001).
- 19) Wakabayashi I.: Pharm. Toxicol. 84, 288 (1999).

- 20) Kim B. R. et al.: *Neuroscience Lett.* 309, 67 (2001).
- 21) Yasuo T. et al.: *Am. J. Chin. Med.* 16, 145 (1988).
- 22) Hamada H., Hiramatsu M., Mori A.: *Arch. Biochem. Phys.* 306, 261 (1993).
- 23) Yhao Z. H. et al.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1885 (1999).
- 24) Gao Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 643 (1999).
- 25) Gao Z., Huang K., Xu H. B.: *Pharmacol. Res.* 43, 173 (2001).
- 26) Gabrielska J. et al.: *Z. Naturforsch.* 52, 817 (1997).
- 27) Hara H. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 221, 193 (1992).
- 28) Sato T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 721 (1992).
- 29) Martin J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách *Scutellaria baicalensis* G., dizertační práce, 2006
- 30) Lee M. J. et al.: *Nutr. Cancer* 34, 185 (1999).
- 31) Hsu S. L. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 425, 165 (2001).
- 32) Konoshima T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 531 (1992).
- 33) Chan F. L. et al.: *Cancer Lett.* 160, 219 (2000).
- 34) So F. V. et al.: *Cancer Lett.* 112, 127 (1997).
- 35) Hiu K. M., Wang X. H., Xue H.: *Planta Med.* 66, 91 (2000).
- 36) Wang H. H., Liao J. T., Chen C. F.: *J. Ethnopharm.* 73, 185 (2000).
- 37) Sieh D. E., Liu L. T., Liu C. C.: *Anticancer Res.* 20, 1861 (2000).
- 38) Kimura Y. et al.: *Planta Med.* 67, 331 (2001).
- 39) Nakajima T. et al.: *Planta Med.* 67, 132 (2001).
- 40) McGuffin M. et al.: *American Herbal Product Association's Botanical Safety Handbook*, CRC Press, Boca Raton 1997, s. 105.
- 41) Wong M. et al.: *Arch. Gen. Psychiat.* 55, 1033 (1998).
- 42) D'Arcy P.: *Adverse Drug React Toxicol. Rev.* 12, 147 (1993).
- 43) Hubík J. et al.: *Obecná farmakognosie II.*, SPN, Praha, 1989, s.31-36
- 44) Dewick P. M.: *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*, J. Wiley & Sons Ltd., Chichester, s. 109, 135 (1997)

- 45) Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 1995, s. 13-23, 79-82
- 46) Ellis B. E., Towers G. H. N.: J. Biochem. 118, 291 (1970).
- 47) Bentley R.: Crit. Rev. Biotechnol. 19, 1 (1999).
- 48) Ushiyama M., Kumagai S., Furuya T.: Phytochemistry 28, 335 (1989).
- 49) Hamada H. et al.: Phytochemistry 44, 615 (1997)
- 50) Shimoda K., Hirata T.: J. Mol. Catal. B-Enzym. 8, 255 (2000).
- 51) Hughes J. B., Shanks J., Vanderford M. et al.: Environ. Sci. Technol. 31, 266 (1997).
- 52) Procházka S. et al: Fyziologie rostlin, Academia, Praha, 1998, s.412-430
- 53) Beiderbeck R., Reichling J.: Pflanzenzellkulturen in Forschung und Praxis, Teil V/1.Biologie 3, 1989, s.188-193
- 54) Chasan R.: J. Plant Cell 7, 495 (1995)
- 55) Ledvina M.: Biochemie, Karolinum, Praha, 1993, s.256
- 56) DiCosmo F., Misawa M.: Biotechnol. Adv. 13, 425 (1995).
- 57) Kolektiv autorů: European Pharmacopoeia 4th Edition, EDQM, Strasburg 2002.
- 58) Kolektiv autorů: ČSN ISO 3534-1, Statistika - slovník a značky, část 1.: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny, ČNI, Praha 1994, s. 4.
- 59) Kolektiv autorů: Věstník SÚKL 1, 6 (1994).
- 60) Reisenauer R.: Metody matematické statistiky, SNTL, Praha 1970, s.31.
- 61) Martin J., Dušek J.: Praktické lékárenství 1, 27 (2005)
- 62) Bethke P.C., Jones R.L.: Curr. Opin. Cell Biol. 3, 469 (2000)
- 63) Theodoulou F.L.: Biochim. Biofyz. Acta 1465, 79 (2000)
- 64) Klein M. et al: Phytochemistry 56, 153 (2001)
- 65) Barceló R.A.: Trends in plant science 3, 418, 1998

- 66) Lamb C., Dixon R.A.: *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251, 1997
- 67) Shimada N. et al: *Plant Sci.* 160, 37 (2000)
- 68) Armero J: *Plant Physiol. Biochem.* 29, 785 (2001)
- 69) O'Neill S.D., Spanswick M.: *Plant Physiol.* 75, 586 (1984)
- 70) Villegas M. et al: *Plant Physiol.* 38, 233 (2000)
- 71) Martinoia M. et al: *Nature* 364, 247 (1993)
- 72) Klein M, Martinoia M., Weissenböck G.: *FEBS letters*, 420 (1997)
- 73) Morimoto S. et al: *J. Biol. Chem.* 273, 12606 (1998)
- 74) Pádua M. et al: *Plant Physiol. Biochem.* 37, 131 (1999)
- 75) Gutierrez M.C. et al: *Phytochemistry* 38, 1185 (1995)

9. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA

Obr.č. 1: Šišák bajkalský (*Scutellaria baicalensis* G.)



Obr.č. 2: Šišák bajkalský - detail



Obr.č. 3: *Scutellariae radix*



Obr.č. 4: Suspenzní kultury š.bajkalského na třepačce



Obr.č. 5: HPLC chromatograf JASCO



Obr.č. 6: Box s laminárním prouděním Fatran L-F

