

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMAKOGNOZIE**

---



Diplomová práce

**VLIV ABIOTICKÝCH ELICITORŮ**  
**NA OBSAH SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ**  
**V *IN VITRO* KULTURÁCH ROSTLIN – II.**

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

Vedoucí katedry: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2021

Barbora Tomaidesová

Děkuji mojí vedoucí diplomové práce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za ochotu, odborné vedení, poskytování cenných rad a pomoc při sestavování této diplomové práce. Dále pak PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za pomoc při HPLC analýze vzorků.

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

Barbora Tomaidesová

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	CÍL PRÁCE .....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
3.1	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn .....	10
3.1.1	Matečná rostlina .....	10
3.1.1.1	Zařazení [3].....	10
3.1.1.2	Výskyt.....	10
3.1.1.3	Botanický popis rostliny .....	11
3.1.2	Lékopisné články.....	11
3.1.2.1	Ostropestřecový extrakt suchý čištěný a standardizovaný [10].....	11
3.1.2.2	Plod ostropestřece mariánského .....	12
3.1.2.2.1	Sklizeň, sušení.....	12
3.1.3	Obsahové látky .....	12
3.1.3.1	Silymarinový komplex .....	13
3.1.3.2	Biosyntéza složek silymarinového komplexu [14].....	14
3.1.3.3	Chemické vlastnosti a možnosti obměny struktury .....	16
3.1.3.4	Snaha o zvyšování produkce silymarinového komplexu .....	16
3.1.3.5	Mechanismus účinku .....	17
3.1.4	Použití a farmakologické účinky .....	18
3.1.4.1	Registrované léčivé přípravky [20] .....	20
3.1.4.2	Homeopatické přípravky [21].....	20
3.1.5	Nežádoucí účinky, kontraindikace, lékové interakce.....	21
3.1.5.1	Nežádoucí účinky .....	21
3.1.5.2	Kontraindikace [13].....	21
3.1.5.3	Lékové interakce.....	21
3.2	Explantátové kultury.....	22
3.2.1	Definice .....	22
3.2.2	Totipotence rostlin.....	22
3.2.3	Založení explantátové kultury [22,24] .....	23
3.2.4	Podmínky kultivace rostlinných buněk .....	24
3.2.4.1	Specifika a odlišnosti rostlinných kultur [25].....	25
3.2.5	Typy kultur .....	25
3.2.5.1	Kalusová kultura.....	25

3.2.5.2	Suspenzní kultura .....	25
3.2.6	Kultivační zařízení [22].....	26
3.2.7	Vnější a vnitřní faktory kultivace.....	27
3.2.7.1	Vnější faktory .....	27
3.2.7.1.1	Teplota [22,25].....	27
3.2.7.1.2	Osvit [22,25] .....	27
3.2.7.1.3	Přísun kyslíku [25].....	27
3.2.7.1.4	pH prostředí a osmotický tlak [25,26] .....	27
3.2.7.2	Vnitřní faktory [23] .....	28
3.2.8	Složení kultivačního média .....	28
3.2.8.1	Makrobiogenní prvky [23,26].....	28
3.2.8.2	Mikrobiogenní prvky [23,26] .....	30
3.2.8.3	Fytohormony .....	31
3.2.8.3.1	Auxiny.....	31
3.2.8.3.2	Cytokininy.....	32
3.2.8.3.3	Gibereliny .....	32
3.2.8.3.4	Kyselina abscisová [23] .....	33
3.2.8.3.5	Etylén .....	33
3.2.8.3.6	Další fytohormony [23].....	33
3.2.8.4	Další složky média [24].....	34
3.2.8.4.1	Vitamíny .....	34
3.2.8.4.2	Aminokyseliny .....	34
3.2.8.4.3	Nedefinované organické složky média .....	34
3.2.9	Sterilizace kultivačního média a zařízení.....	35
3.3	Využití explantátových kultur .....	36
3.3.1	Fytofarmaka [22].....	36
3.3.2	Strukturní obměny léčiva .....	36
3.3.3	Transgenní rostliny a jejich využití.....	36
3.3.3.1	Kryoprezervace [24] .....	37
3.3.4	Mikropropagace rostlin .....	37
3.3.5	Zvýšení produkce sekundárních metabolitů.....	38
3.3.5.1	Elicitace .....	38
3.3.5.2	Elicitory .....	39
3.3.5.2.1	Abiotické elicitory [23,29].....	39
3.3.5.2.2	Biotické elicitory [23,25,29] .....	39

3.3.5.2.3	Exogenní a endogenní elicitory [29].....	39
3.3.5.3	Stresová reakce .....	40
3.3.5.3.1	Stresová reakce na buněčné úrovni [29] .....	40
3.4	Pyridin .....	41
3.4.1	Základní popis [30] .....	41
3.4.2	Výskyt .....	41
3.4.3	Použití.....	42
3.4.3.1	Součást léčiv .....	42
3.4.4	Elicitační účinky.....	44
3.4.5	Pyridinbenzamidy.....	45
3.4.5.1	Obecné vlastnosti.....	45
3.4.5.2	Biologické účinky.....	45
3.4.5.3	Antituberkulotická aktivita .....	46
3.4.5.3.1	<i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid.....	46
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	48
4.1	Použitý materiál, přístroje a pomůcky .....	48
4.1.1	Rostlinný materiál .....	48
4.1.2	Chemikálie .....	48
4.1.3	Přístroje a pomůcky.....	49
4.2	Průběh kultivace explantátových kultur .....	50
4.2.1	Příprava kultivačních nádob a nástrojů .....	50
4.2.2	Příprava živných půd.....	51
4.2.3	Pasážování kalusové kultury, odvození kultury suspenzní a jejich kultivace....	53
4.3	Elicitace a průběh experimentu .....	54
4.3.1	Příprava roztoku elicitoru.....	54
4.3.2	Elicitace .....	54
4.4	Stanovení obsahu flavonolignanů a taxifolinu .....	55
4.4.1	Příprava vzorků k analýze .....	55
4.4.2	Princip a průběh analýzy .....	55
4.4.3	Kalibrační křivky.....	57
4.4.4	Chromatogram HPLC hlavních obsahových látek ostropestřece.....	60
4.4.5	Statistické vyhodnocení [51,52].....	61
5	VÝSLEDKY .....	63
5.1	Tabulky.....	63

5.1.1	Obsah flavonolignanů ( $\mu\text{g/g DW}$ ) v kalusové kultuře <i>Silybum marianum</i> po působení elicitoru ve třech koncentracích.....	63
5.1.2	Obsah flavonolignanů ( $\mu\text{g/g DW}$ ) v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i> po působení elicitoru ve třech koncentracích.....	64
5.1.3	Obsah flavonolignanů ( $\mu\text{g/ml}$ ) v médiu kalusové a suspenzní kultury <i>Silybum marianum</i> po působení elicitoru ve třech koncentracích .....	65
5.2	Grafy.....	66
5.2.1	Obsah flavonolignanů ( $\mu\text{g/g DW}$ ) v kalusové kultuře <i>Silybum marianum</i> po působení elicitoru ve třech koncentracích.....	66
5.2.2	Obsah flavonolignanů ( $\mu\text{g/g DW}$ ) v suspenzní kultuře <i>Silybum marianum</i> po působení elicitoru ve třech koncentracích.....	67
6	DISKUZE .....	69
7	ZÁVĚR .....	74
8	SEZNAM LITERATURY .....	76
9	ABSTRAKT .....	81
10	ABSTRACT.....	82

# 1 ÚVOD

Na počátku rozvoje farmacie stála bezesporu rostlinná říše jako hlavní zdroj léčivých látek. Dlouhou dobu hrála přírodní léčiva primární roli v terapii rozličných onemocnění. I když s nástupem látek syntetického původu byl postupně význam přírodních látek upozaďován, nikdy nevymizela zcela díky své strukturní a funkční specifitě. Do dnešní doby své farmakologické účinky uplatňují složky opia, digoxin, taxol atd. Získávání těchto léčiv izolací z rostlinného materiálu nelze z ekonomického důvodu a možnosti realizace nahradit chemickou syntézou. Navíc zůstaly molekuly izolované z přírodních zdrojů jedním z hlavních předobrazů a pramenů pro čerpání inspirace pro vývoj chemických léčiv.

V současné době zažívá přírodní medicína postupný návrat do popředí zájmu. Stojí za tím nejen stále větší obliba v přírodních doplňcích stravy a alternativní medicíně. Dalším důvodem je i posun ve fytochemickém složení obsahových látek směrem k zvýšené syntéze cílových látek a potlačení produkce ostatních metabolitů. S výhodou se využívá i široké biosyntetické kapacity rostlin, kdy společně interagují jednotlivé produkty, potencují svůj účinek a mají tak za výsledek komplexní léčebné působení. Svou roli hraje i strukturní rozmanitost a pestrost, která má velký potenciál do budoucna.[1]

Progresivní metodou v získávání sekundárních metabolitů se jeví využití explantátových kultur rostlinných buněk či orgánů. Jedná se o proces, který probíhá za řízených podmínek. Můžeme tak docílit stabilně vyšších výnosů a stále nezávislé produkce.[2] Koncentraci konečných produktů můžeme dále násobit například působením řízeného stresu na rostlinu – elicitací, kdy napadená rostlina v reakci na přítomný stresor zvýší syntézu svých obranných látek. Je ale důležité zjistit, který druh elicitoru, v jaké koncentraci a po jak dlouhé době působení, dosáhne optimální účinnosti.



## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo seznámit se s problematikou explantátových kultur a zvládnout techniku jejich kultivace v laboratorním měřítku. Následně prověřit vliv nového antituberkulotika *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamidu jako abiotického elicitoru pro zvýšení produkce flavonolignanů a flavonoidu taxifolinu v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum*. Míru účinku na produkci těchto sekundárních metabolitů rostlinných kultur kvantifikovat pomocí metody HPLC a určit, v kterých koncentracích a po jak dlouhé době působení skutečně došlo k pozitivnímu ovlivnění sekundárního metabolismu rostlinných buněk.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 *Silybum marianum* (L.) Gaertn

#### 3.1.1 Matečná rostlina

Ostropestřec mariánský, vědeckým názvem *Silybum marianum* (L.) Gaertn, patří mezi významné léčivé byliny, jehož účinky se využívají již stovky let na rozličná onemocnění. [3,4] Historicky však sloužil jako běžná součást potravy, např. jako zelenina do salátů či jako náhražka špenátu. Pražené plody byly dokonce používány jako náhrada za kávová zrna. [5]

Mezi jeho první indikace k léčebnému použití bylo již v raném středověku nechutenství a křečovitě bolesti břicha. Po dlouhou dobu až do současnosti byl jeho plod užíván na choroby žlučníku a při žloutence. Postupně se však stále více vědeckých skupin zabývalo jeho dalšími vlastnostmi a jak se zdá, paleta ostropestřecových účinků je více než pestrá. [6]

##### 3.1.1.1 Zařazení [3]

Jedná se o jednoletou až dvouletou bylinu z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Patří tak do podříše cévnatých rostlin (*Tracheobionta*), oddělení krytosemenných (*Magnoliophyta*), třídy vyšších dvouděložných rostlin (*Rosopsida*) a řádu hvězdnicotvarých (*Asterales*).

##### 3.1.1.2 Výskyt

Pochází z jižní Evropy, jižního Ruska, Malé Asie a severní Afriky, tedy oblasti Středomoří. Na území České republiky se běžně nevyskytuje, pouze za účelem pěstování. [4,7] Pro správný růst potřebuje hodně světla a vláhy. Vyhovuje mu kyprá, nekyselá půda. [8]

### 3.1.1.3 Botanický popis rostliny

Dorůstá až 3 m do výšky (průměrně však 0,9–1,8 m) a až 1 m do šířky. [4] Kořen je vřetenovitý. [8] Jeho pestré tmavě a světle zelené listy jsou ostnaté a pilovatě vykrojené, dlouhé někdy i 75 cm a široké až 30 cm. Vyrůstají střídavě na větvené žabernaté lodyze. Na lícové straně jsou hladké a lesklé, na spodní straně chlupaté. Svému přízvisku mariánský vděčí bílému žíhání na vrchní straně listu. [4,7,8] Peřenolaločnaté spodní listy tvoří přízemní růžici. Listeny zákrovu nesou ostré žluté bodliny. [3]

Kvete od července do září typicky rudofialově, zřídka bleděfialově či bíle. Květy jsou oboupohlavné, veliké 4–8 cm. Skládají se z 50–200 tubulárních kvítků v takzvaný úbor. Vyrůstají po jednom na dlouhých stopkách. [3,4,7] Plody (nažky) jsou srostlé do kruhu. Jejich vůně je podobná kakau, chuť mastná a hořká. Dorůstají rozměrů 5–8 mm na délku, 2–3 mm do šířky a jsou 1,5 mm silné. Slupka se leskne, má hnědočernou až naředlou barvu. Na povrchu jsou jemné štětinky, které snadno opadávají. [4,9]

### 3.1.2 Lékopisné články

#### 3.1.2.1 Ostropěstřecový extrakt suchý čištěný a standardizovaný [10]

Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum. Vyrábí se z drogy Silybi mariani fructus, kdy standardizovaný obsahuje 90–110 % silymarinu vyjádřeného jako silybin. Jako vhodná rozpouštědla pro získání tohoto extraktu se užívají etyl-acetát či aceton, etanol, metanol nebo jejich směs s vodou. Výsledný amorfni prášek má žlutohnědou barvu.

Do obsahu silymarinu se počítá:

- součet obsahů silychristinu a silydianinu: 20 % až 45 %, vztaženo k celkovému obsahu silymarinu
- součet obsahů silybinu A a silybinu B: 40 % až 65 %, vztaženého k celkovému obsahu silymarinu

- součet obsahů isosilybinu A a isosilybinu B: 10 % až 20 %, vztaženého k celkovému obsahu silymarinu

### 3.1.2.2 Plod ostropestřce mariánského

Silybi mariani fructus. [10] Ačkoliv by se dle vzhledu mohlo zdát, že jde o semeno, technicky správně se jedná o plod. [4] Drogu tvoří usušený plod zbavený chmýru. [9] Chutná nahořkle a je bez žluklého pachu. [7] Lékopisná droga obsahuje nejméně 1,5 % silymarinu vyjádřeného jako silybin ve vysušené droze. [10]

Nažky mají podlouhle vejčitý tvar, bývají silně zmáčkklé. Dosahují rozměrů 6–8 mm na délku a 3 mm na šířku, silné jsou asi 1,5 mm. Na spodu jsou zúžené, nahoře vyčnívá asi 1 mm vysoký kruhový okraj, který uzavírá zbytek čnělky. Zvnějšku je povrch plodu hladký, šedý až světle hnědý s tmavě hnědým podélným žíháním. V příčném řezu se odkryjí dvě velké bílé olejnaté dělohy a úzké hnědé oplodí. [10]

#### 3.1.2.2.1 Sklizeň, sušení

Jedná se o velmi náročnou proceduru, od které se odvíjí výnos a kvalita drogy. Je nemožné sklízet semena v optimálním stavu zralosti s nejvyšší hladinou obsahových látek, neboť úbory ostropestřce dozrávají postupně odshora dolů, zároveň však semena v úborech dozrávají od středu k obvodu. [11]

Typicky ke sběru dochází v období dozrávání úborů na hlavních lodyhách, tedy koncem srpna až začátkem září, kdy jsou úbory rozevřené a objevuje se bílé chmýří asi na jedné třetině z nich, zbylé úbory v té době zasychají. [7,8] Může proběhnout takzvaná desikace porostu neboli umělé vysušení. Následně se úroda sklízí mlátičkou. [7]

Nažky se dále musí upravit čištěním, zbavením chmýru a dosušením, při kterém maximální teplota nesmí přesáhnout 50 °C. [7,8]

### 3.1.3 Obsahové látky

Důležitou léčivou látkou je silymarin, označovaný též jako silymarinový komplex, jenž působí jako silný antioxidační a detoxikační prostředek. [9,12] Tvoří

1,5–3 % sušiny plodu. Jedná se vlastně o izomerní směs flavonolignanů. [4] Vedle této skupiny látek obsahuje i flavonoidy (taxifolin, kvercetin, dihydrokempferol, kempferol, apigenin, naringin, eriodictiol a chrysoeriol), 5,7-dihydroxychromon, dehydrokoniferylalkohol, 20–30 % fixovaného oleje (hlavně kyselina linolová, olejová a palmitová, také stearová a myristová), tokoferol, steroly (cholesterol, kampesterol, stigmasterol a  $\beta$ -sitosterol), cukry (arabinóza, ramnóza, xylóza a glukóza), 20–30 % bílkovin, aminy (tyramin, histamin), hořčiny a silici. [4,7,9]

### 3.1.3.1 Silymarinový komplex

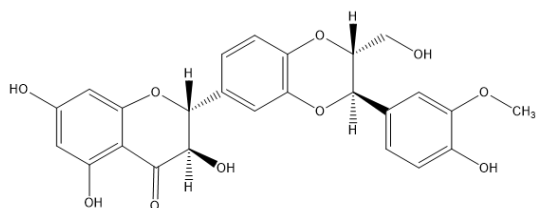
Složky silymarinu lze rozdělit na dvě skupiny hlavních a vedlejších látek. Mezi tři hlavní látky patří silybin, který je tvořený v poměru 1:1 svými *trans* diastereoizomery silybinem A a B (silybininem A a B), silychristin a silydianin. Vedlejšími látkami jsou isosilybin A a B (isosilybinin A a B), isosilychristin a silymonin, dehydrosilybin, deoxysilycystin, deoxysilydianin, silandrin, silybinom, silyhermin a neosilyhermin. [4,9,13,14]

50–70 % extraktu silymarinu však zaujímá flavonolignan silybin, který je tak hlavní bioaktivní složkou. Jeho struktura byla popsána v roce 1975 pomocí degrační metody. Jedná se o druhově zcela specifický sekundární metabolit. [14] Skládá se ze dvou částí. [4]

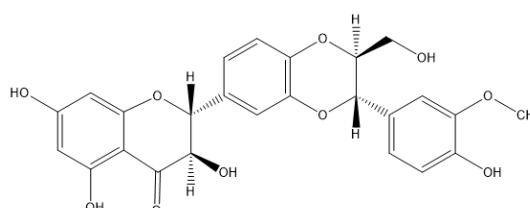
První je odvozena od flavonoidu taxifolinu a druhá od koniferylalkoholu, což je fenylypropanoidová jednotka, která je běžnou součástí ligninu. Odtud tedy pochází souhrnné označení pro tento typ sekundárních metabolitů – flavonolignany. Obě součásti jsou propojeny v jednu molekulu pomocí 1,4-dioxanového kruhu. [4]

Obr. 1: Důležité obsahové látky plodu ostropestřce mariánského [5,14]

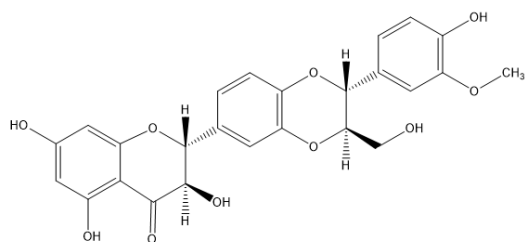
Silybin A



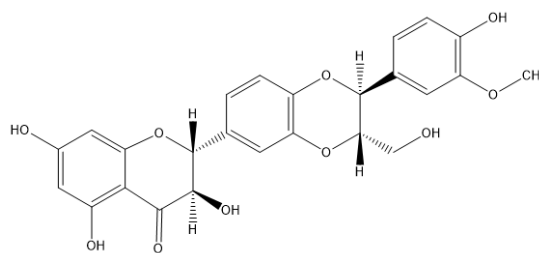
Silybin B



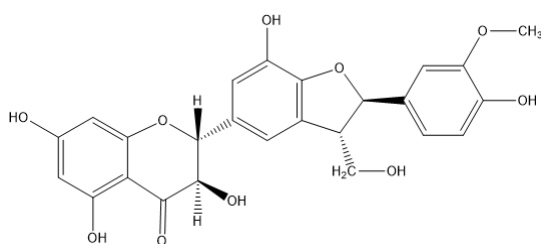
Isosilybin A



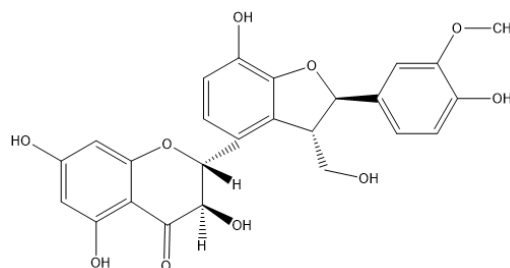
Isosilybin B



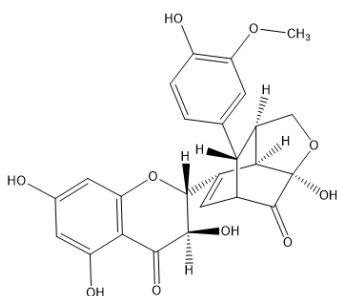
Silychristin



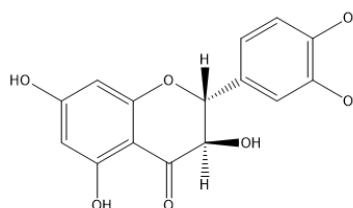
Isosilychristin



Silydianin



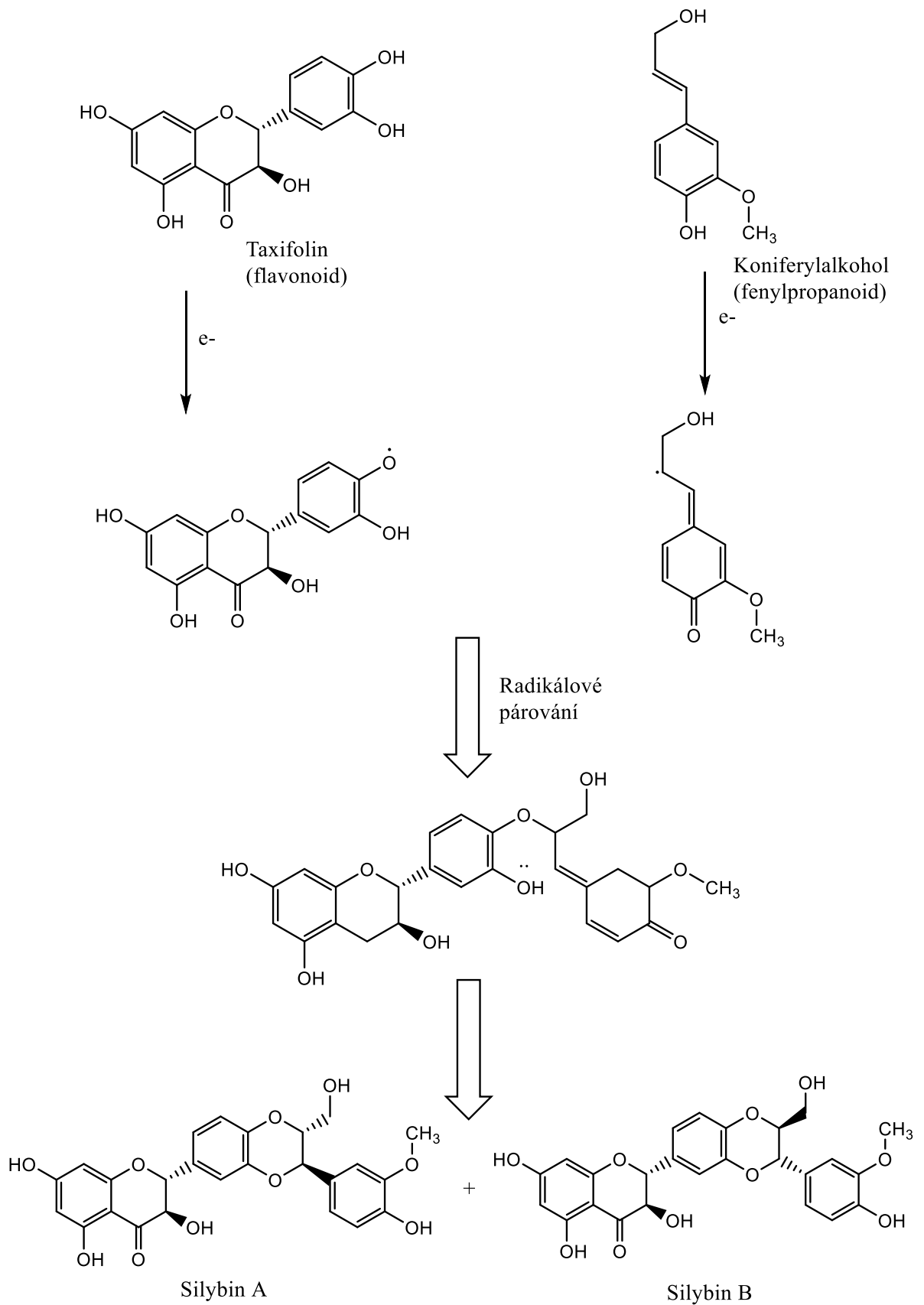
Taxifolin



### 3.1.3.2 Biosyntéza složek silymarinového komplexu [14]

Biosyntéza probíhá oxidační vazbou mezi volnými radikály vzniklých z taxifolinu a koniferylalkoholu. Následně tedy vytvoří adukt, který se nestereospecificky zacyklí s fenolovým nukleofilem vzniklým z koniferylalkoholu. Silydianin jako složitější struktura vzniká intramolekulární cyklizací a následným vytvořením hemiketalu z mezomeru volného radikálu odvozeného od taxifolinu.

Obr. 2: Biosyntéza silybinu [14]



### 3.1.3.3 Chemické vlastnosti a možnosti obměny struktury

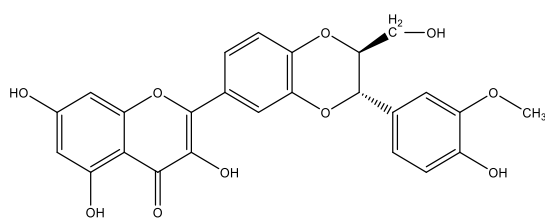
Silybin je poměrně stálý v kyselém prostředí, méně pak v bazickém. Snadno oxiduje na 2,3-dehydrosilybin. Na molekule se nachází celkem 5 volných hydroxyskupin, které jsou jasným cílem pro vytvoření derivátů. [4] I přes přítomnost polárních skupin se jedná o velmi lipofilní látku, která se pouze omezeně rozpouští ve vodě. [15]

Nové deriváty mají za cíl především zlepšit biologickou dostupnost a tím i účinnost silybinu. Jeho rozpustnost byla zvýšena úpravou na 3,23-O-bishemisukcinát, jež umožňuje intravenózní podání při terapii akutní intoxikace způsobené *Amanitou phalloides*. [15]

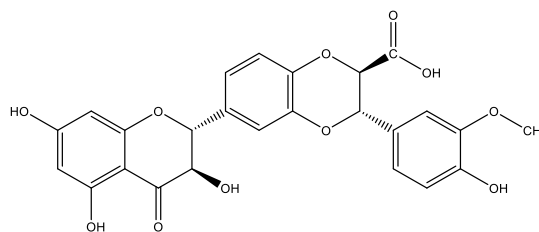
Obecně je silybin ve formě glykosidu lépe dostupný pro využití organismem. Alternativou je vytvořit komplex silybinu s fosfatidylcholinem a významně tak zvýšit biologickou aktivitu. Možností je i připojit na základní skelet karboxylovou skupinu, a tím zvýšit jeho hydrofilitu, zároveň se tak posílí antioxidační účinnost. [15]

Naopak lipofilnější 2,3-dehydroderiváty prokázaly výhodné zlepšení antilipoperoxidační aktivity a vychytávání volných radikálů v lipofilním prostředí. S prospěchem je tedy lze užívat ve formě masti. [15]

Obr. 3: 2,3-dehydrosilybin [15]



Obr. 4: Silybinová kyselina [15]



### 3.1.3.4 Snaha o zvyšování produkce silymarinového komplexu

Obecně se ze sušené drogy nešlechtěné rostliny dokáže získat při dobré úrodě a správné technice sklizně stále jen malé množství bioaktivních složek. Snaha tento podíl navýšit se ubírá několika směry.

Za prvé bylo vyšlechtěno několik odrůd, které se mezi sebou liší obsahem a poměrem jednotlivých látek v silymarinovém komplexu. Některým z těchto odrůd však již skončila registrace. Ke dni 1. 10. 2020 bylo ve Věstníku Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského uvedeno 6 odrůd – Aida, Albus, Mirel, Moravia55,



Tevadian a Tevasil. Na vývoji některých z nich se podílel i tým z Univerzity Palackého ve spolupráci s firmou Teva Czech Industries s.r.o. [16,17]

Ve dvou dalších případech lze využít explantátové kultury. Buď je možno přidat do živného média prekurzory cílových látek, např. koniferylalkohol navázaný na  $\beta$ -cyklodextrin. Pak byla zjištěna zvýšená syntéza silydianinu a taxifolinu. Pokud byl jako prekurzor použit samotný koniferylalkohol, zvedla se produkce pouze silydianinu. [5]

Poslední možností je působení elicitoru na rostlinné explantáty a následné vyvolání odpovědi zahrnující zvýšenou produkci požadovaných sekundárních metabolitů. Více viz kapitola 3.5.

### 3.1.3.5 Mechanismus účinku

Ostropestřec působí třemi hlavními způsoby. Slouží jako antioxidant, protizánětlivě a antifibroticky.

Nejvíce probádaný je účinek protizánětlivý. Silymarin inhibuje transdukční kaskádu řízenou nukleárním faktorem kappa B (NF- $\kappa$ B), jež indukuje přepis genů kódujících prozánětlivé cytokiny, a současně reguluje přežití zánětlivých T-buněk. Mimo jiné ovlivňuje a snižuje produkci cyklooxygenázy 2. Taktéž inhibuje 5-lipooxygenázu, čímž chrání žaludeční sliznici před vznikem vředu a zároveň klouby před zánětem. Silybin, dle studií na myších, dokáže zesílit protizánětlivý účinek podporou produkce interleukinu 10. [18]

Jeho antioxidantní působení vychází z inhibice tvorby volných radikálů vznikajících během metabolismu toxických látek (etanol, acetaminofen, tetrachlormetan). Silymarin posiluje jejich vychytávání zvýšením sérové hladiny intracelulárních lapačů volných radikálů (superoxiddismutázy, glutathionperoxidázy a glutathionu) či podporou jejich činnosti. Také propaguje tvorbu buněčných bílkovin, které slouží jako ochrana buňky před působením volných radikálů. Silybin posiluje tento proces chelatací železa. [18]

Antifibrotická aktivita spočívá v inhibici transformace hvězdicovitých hepatocytů na myofibroblasty. Silybin nepřímo ovlivňuje ukládání kolagenových vláken, která

podporují poškození jater. Těž snižuje hladiny pro fibrotizaci klíčového transformujícího faktoru beta (TGF- $\beta$ ). [18]

Podpora regenerace jaterního parenchymu je podmíněna zejména možnostmi účinné látky proniknout až do jader hepatocytů, kde vyvolá syntézu bílkovin, čímž dochází k opravě poškozených buněk a tvorbě nových jaterních enzymů. Váže se ale i na membrány jaterních buněk, a tím zabraňuje průniku toxinů. [14]

Silymarinový komplex silně inhibuje TNF- $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor alfa), v důsledku toho tedy snižuje cytotoxicitu, zánět a apoptózu buněk. [13]

Silybin také inhibuje  $\beta$ -glukuronidázu, čímž zabraňuje hydrolyze glukuronidů na toxické produkty. Takto napomáhá poškozeným játrům či předchází rozvoji střevních kancerózních změn. [13]

Silymarin a hlavně silybin má dle testů *in vitro* taktéž slibnou antiproliferativní aktivitu na androgen-dependentní nádorové buňky prostaty. Silychristin a silybin v *in vitro* testech potvrdily nefroprotektivní účinky proti nežádoucím účinkům některých léčiv (paracetamol, cisplatina, vinkristin apod.). [13]

Pozitivní účinky silymarinového komplexu jsou podpořeny dobrým vstřebáváním z trávicí soustavy a rychlým vyloučením do žluče. Především však enterohepatálním oběhem, který podmiňuje ochrannou funkci silymarinu proti hepatotoxinům. [9]

#### 3.1.4 Použití a farmakologické účinky

Hlavní působení silymarinu se soustřeďuje na játra a žlučník. [12] Slouží jako hepatoprotektivum. [9] Obecně jsou jeho účinky vyšší v preventivním užití než v léčebném režimu. [7]

Mezi stavy, které je možno užíváním silymarinu zmírnit či léčit, patří nealkoholická steatóza jater, hepatitidy i posthepatální syndrom, infekční mononukleóza či otrava alkoholem, léky, drogami a jedovatými houbami. Nápomocný je i při dalších chronických degenerativních stavech jater. [12,18] Doloženo je i jeho zabránění projevů toxických účinků tetrachlormetanu, amanitinu, faloidinu a dalších jedů. [9]

Dále podporuje trávení stimulací tvorby a distribuce žlučnickových šťáv a je vhodné použít ho při zažívacích obtížích různé etiologie. [12] Slabě funguje i jako spasmolytikum. [9]

Prokázala se i souvislost mezi užíváním silymarinu a snížením hladiny inzulinu na lačno či ovlivněním inzulinové rezistence. [18] Nové studie poukazují i na jeho anticholesterolemický efekt. [5]

Pravděpodobně je užívání silymarinu spojeno i s možností prevence proti vzniku rakoviny kůže. Také dokázal potlačit rakovinotvorné působení některých látek. Patrně by se s výhodou mohl užívat při perorální léčbě chemoterapeutiky pro neutralizaci jejich nežádoucích účinků na játra. Zároveň však může potencovat i chemoterapeutický efekt. [14,15]

Ve studii s morčaty silymarin prokázal schopnost snížit reakci dýchacích cest na uvolněný histamin, a tak zabránit anafylaktické reakci. Je ho tak možné využít jako podpůrný prostředek v terapii bronchiálního astmatu. [14]

Dokonce proběhla i 8týdenní dvojité zaslepená randomizovaná studie, v níž se zkoumal efekt extraktu ze *Silybum marianum* na pacienty s obsedantně-kompulzivní poruchou. I v tomto směru prokázal pozitivní efekt již po 5 týdnech užívání snížením obtíží. [14]

Zkoumání, které bylo zaměřené na možné zvýšení laktace spojené s užíváním silymarinu, potvrdilo, že se při orálním podávání zvedla hladina cirkulujícího prolaktinu a neklesla pod běžnou hranici dalších 66 dní. [14]

Použití ostropestřece je možno v několika formách, například jako suchý extrakt v kapslích a tabletách, jeho tinkturu či olej. Podání je možné i intravenózně jako infúze silymarinu při otravě mykotoxiny muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*, Pluteaceae). [12,18] Doporučená denní dávka je 4,0–5,0 g. [9] Používá se ale i odvar ze 3 g drcené drogy minimálně 3x denně. V případě využití drcené drogy je nutno namlít plod těsně před použitím kvůli oleji, který žlukne. [7] Avšak tento způsob použití je při nejmenším sporný, neboť silymarin, jakožto komplex velkých lipofilních molekul, je jen velmi málo rozpustný ve vodě a do odvaru se prakticky nevytluhuje. [19]

Navzdory mnoha studiím, zkoumání a dokládání účinnosti není používání ostropestřece mariánského doporučeno v běžné klinické praxi. Je potřeba dalšího výzkumu pro lepší rozpoznání buněčných cílů jak silymarinu tak silybinu, který by nás mohl dovést ke komplexnější a specifitější sloučenině, jež by byla použitelná pro širokou škálu jaterních onemocnění. [18]

#### 3.1.4.1 Registrované léčivé přípravky [20]

Ostropestřecový extrakt suchý čištěný a standardizovaný je i hlavní součástí a účinnou látkou hned několika registrovaných léčivých přípravků. Vyskytuje se v množství 50 mg, 70 mg, 140 mg a 150 mg. Jedná se o přípravky Silymarin AL©, Flavobion©, Legalon© a Lagosa©.

Terapeutické indikace těchto přípravků zahrnují podpůrnou léčbu chronických zánětlivých jaterních onemocnění, chronické perzistující či aktivní hepatitidy, jaterní cirhózy a toxicko-metabolické poškození jater (steatóza jater, hepatotoxická léčiva apod.). Podmínkou užití a následného terapeutického úspěchu je přerušování působení spouštěče poškození. Neslouží k léčbě akutních otrav ani k předcházení příčin jaterního poškození (např. alkoholem).

Doporučené dávkování se u jednotlivých přípravků různí, liší se i v závislosti na vážnosti stavu pacienta. Obecně lze tato léčiva podávat dětem od 12 let. Na počátku léčby se denní dávka pohybuje od 420–450 mg rozdělených do 3 dávek, v pokračovací terapii dosahuje celková dávka 200–300 mg rozdělená do 2–3 dílčích dávek. U některých přípravků je doporučeno užívat je s jídlem. Délka terapie trvá až rok, zpravidla se však doba podávání silymarinu odvíjí od stavu pacienta a jeho odpovědi na léčbu.

Silymarinový standardizovaný extrakt je součástí i kombinovaného léčivého přípravku Iberogast©, který ulevuje při zažívacích obtížích spojených s poruchou funkce a motility střev a žaludku.

#### 3.1.4.2 Homeopatické přípravky [21]

Ostropestřec mariánský našel své uplatnění i v homeopatii. Je indikován ve stejných případech jako klasické léčivé přípravky. Zejména se jedná o akutní

i chronické onemocnění žlučníku a jater, žloutenku, cirhózu a ascites. Doporučuje se ale i v případě onemocnění venózního systému – hemoroidů a varixů.

Název přípravku je Carduus Marianus© v ředění 5–9 C, užívá se 2krát denně až 3 měsíce.

### 3.1.5 Nežádoucí účinky, kontraindikace, lékové interakce

#### 3.1.5.1 Nežádoucí účinky

Užívání léčivých přípravků obsahujících standardizovaný silymarinový extrakt je v terapeutickém rozmezí bezpečné. Mohou se však jako u všech látek vyskytnout i nežádoucí účinky soustředné zejména v gastrointestinálním traktu (změkčení stolice, flatulence, pocit naplnění žaludku, průjem). Dále se jedná o bolest hlavy či kožní vyrážku, kopřivku a svědění. [13,18]

Výzkum prokázal, že silybin může inhibovat serinové proteázy zúčastněné v kaskádě krevního srážení a snížit tak reakci krevních destiček. [4]

#### 3.1.5.2 Kontraindikace [13]

Mezi kontraindikace a stavy, kdy by se silymarin neměl užívat, patří přecitlivělost na látku, gravidita a kojení. Není též vhodný pro děti do 5 let.

#### 3.1.5.3 Lékové interakce

Podle dostupných dat z výzkumů *in vitro* vyplývá, že silymarinový komplex snižuje aktivitu cytochromu P450 (zejména CYP 2D6 ale i CYP 2E1, CYP 3A4, CYP 2C9, CYP 2C8) a UDP-glukuronyltransferázy. Z tohoto tedy plynou možné interakce s ostatními léčivy probíhají na úrovni metabolismu. [4,13,18]

V první řadě jde o léčiva, která podléhají tvorbě glukuronidů a mohla by se při pravidelném užívání silymarinu hromadit, a tak zvýšit svoje hladiny v krvi pacienta. Jedná se zejména o paracetamol, atorvastatin, diazepam, digoxin, entakapon, irinotekan,

lamotrigin, lorazepam, lovastatin, morfin a další. Naopak může obdobným mechanismem zapříčinit zvýšené vylučování estrogenů. [13]

Inhibice CYP 2D6 nejvíce ovlivňuje léčiva jako amitriptylin, diazepam, verapamil, warfarin atd. U těchto léčiv je na místě opatrnost v dávkování. [13]

Při současném používání amiodaronu a silymarinového extraktu nelze vyloučit zvýšení antiarytmického účinku amiodaronu. [20]

## 3.2 Explantátové kultury

### 3.2.1 Definice

Explantátem rozumíme celou rostlinu, embryo či pouze oddělenou část mateřské rostliny. Může se jednat o jednotlivé orgány či neorganizované pletivo (= kalus), shluky buněk, jednotlivé buňky či pouhé protoplasty (= rostlinné buňky zbavené buněčné stěny), které se kultivují za aseptických podmínek *in vitro*. [22,23] Získávají se izolací z přírodních materiálů nebo ze sbírky. Z každé takto vyzískané buňky pak lze zpětně vypěstovat plnohodnotnou rostlinu. To umožňuje tzv. totipotence rostlinných buněk. [22]

### 3.2.2 Totipotence rostlin

Hlavní roli v projevení totipotence rostlinných buněk hrají fytohormony. Pokud je funkční vnitřní signální síť, je možné vlivem fytohormonů z libovolné diferencované buňky získat plně funkční buňku jiného typu, jelikož má v genomu zakódované veškeré geny. Schopnost regenerace rostlin se využívá v experimentálních výzkumných pracích, kdy je možno z jediné buňky *in vitro* získat organismus s upravenými vlastnostmi. [23] Rostlina tak projde cyklem, kdy z několika buněk získaných z rostliny *in vivo*, kultivací explantátu *in vitro* a aklimatizací zakořeněné rostliny *ex vitro*, získáme opět novou rostlinu *in vivo*. [24]

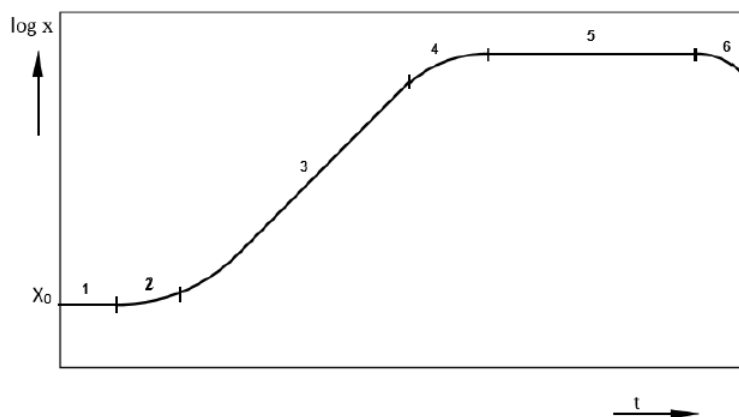
### 3.2.3 Založení explantátové kultury [22,24]

Po odebrání několika buněk z kterékoli nadzemní či podzemní části rostliny se tyto přesunou na tuhou živnou půdu a inkubují se za teploty 23–28 °C. Získávají se buď ze sterilní rostliny nebo se sterilizuje určitá rostlinná část. Pro dokonalé odstranění nečistot a mikroorganismů se používají dezinfekční roztoky a detergenty. Poté se buňky za sterilních podmínek naočkují na sterilní živné půdy a kultivují se za definovaných podmínek. Buňky se začínají dělit, a tak tedy získáme základní kalusovou kulturu, tedy primokulturu. Pokud je to nezbytné, je možné primokultury vyživovat médiem s obsahem antibiotik. Tím zabráníme vnitřní kontaminaci.

Jakmile se buňky rozmnoží a jejich počet se zvýší na tolik, že dosavadní živiny vyčerpají, je možno část staré kultury přenést na nové živné půdy. K tomuto je potřeba vybírat mladé buňky, z procesu je potřeba vyloučit buňky staré nebo dokonce plesnivé či jinak kontaminované. Nové buňky se vybírají cíleně pro jejich schopnost rychle překlenout lag fázi (doba ihned po přesazení, kdy se buňky přizpůsobují novému prostředí a typicky dochází k jejich úbytku) růstové křivky a pokračovat stálým dělením pro nárůst dostatečně početné kultury k provedení biotechnologického procesu.

Růstová křivka popisuje závislost některé z růstových charakteristik kultury (např. čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina) na čase. Na lag fázi navazuje fáze akcelerační, která plynule přechází ve fázi exponenciální. V těchto dvou obdobích se buňky začínají intenzivně množit až dosáhnou maximální konstantní rychlosti dělení. Fáze deklinační a stacionární popisujeme jako postupný útlum dělení buněk až do rovnováhy s jejich odumíráním. Poslední fází je stav převažujícího zániku buněk a postupného konce dělení.

Obr. 5: Růstová křivka explantátové kultury [22]



Legenda:  $x$  – růstová charakteristika (např. hmotnost buněk),  $t$  – čas, 1 – lag fáze, 2 – akcelerační fáze, 3 – exponenciální fáze, 4 – deklinační fáze, 5 – stacionární fáze, 6 – fáze odumírání

Při přenášení do nového živného média se nesmí buňky mechanicky poškodit a zároveň se dodržuje aseptický postup práce tak, aby během něj nedošlo k nežádoucí kontaminaci. Při stálém opakování tohoto procesu jsou pak kultury udržované tímto způsobem v podstatě nesmrtelné. Dlouhá životnost explantátových kultur je tedy podmíněna včasným a pravidelným přesazováním do nádob s novým kultivačním médiem, tzv. pasážováním, které by mělo ideálně proběhnout na konci exponenciální fáze růstové křivky.

### 3.2.4 Podmínky kultivace rostlinných buněk

Buňky kultur mohou být buď kultivovány na zpevněném médiu, nebo jsou rozptýleny v kultivačním médiu a provzdušňovány mícháním (například usazením na třepací stroj) tak, aby nedocházelo k usazování buněk na dně nádoby a nebyla narušena homogenita. [24] Pro zpevnění média se v první řadě používá agar, který je intaktní k ostatním složkám média i k rostlinným enzymům. Je možné užít i agarózu, Phytigel či Gerlite. Alternativou pro tyto látky je vytvoření můstků z filtračního papíru, polyuretanové pěny či použití tzv. rafty, po kterých médium vzlíná a dodává buňkám potřebné živiny. [22,23]



Buňkám je nutné splnit základní výživové požadavky s ohledem na jejich charakteristiky, za kterýchžto podmínek se explantáty pak kultivují ve sterilním prostředí v uzavřené nádobě s kultivačním médiem. Je dobré zajistit postup konzervace této kultury a pro udržení její stability při přeočkování do dalších generací. Je důležité regulovat projevy divokých kmenů buněk a zachovat vysokoprodukční linie. Lze také upravit genom takto získaných buněk, a tím ještě zvýšit budoucí produktivitu. [22]

#### 3.2.4.1 Specifika a odlišnosti rostlinných kultur [25]

Nevýhodou explantátových rostlinných kultur je menší stabilita v produktivitě, jejich vyšší citlivost na poškození střížnými silami, které působí během míchání, pomalý růst a buněčný cyklus, kdy na zdvojnásobení počtu buněk je potřeba počítat s dobou od 25–110 h. Od živočišných kultur se odlišují výrazně nižší spotřebou kyslíku.

#### 3.2.5 Typy kultur

##### 3.2.5.1 Kalusová kultura

Kalusem se rozumí neorganizované pletivo nediferencovaných buněk. Za běžných podmínek slouží rostlinám jako hojivé pletivo v ranách. V kulturách *in vitro* se tvoří buď spontánně, nebo jeho vznik můžeme vyvolat aplikací fytohormonů ve správném poměru, který se odvíjí od typu a stavu rostliny, ze které je explantát získán. Obecně je potřeba dodávat vyšší koncentraci auxinu a udržovat nižší hladinu cytokininů. [22,23]

Rozlišujeme kalus rozpadavý a kalus kompaktní. Z rozpadavého kalusu lze snadno získat a odvodit suspenzní kulturu, kompaktní kalus je k tomuto nevhodný. [24]

##### 3.2.5.2 Suspenzní kultura

Vzniká přenesením rozpadavého kalusu do tekutého média a následným umístěním na třepačku či roller, popřípadě do bioreaktoru s míchadlem. Mícháním či

třepáním je zajištěna homogenita, tedy pravidelné rozmístění jednotlivých buněk i jejich menších shluků. Docílíme tím i rozpadu buněk po jejich dělení. [22,24]

Tento způsob kultivace je výhodnější z pohledu rychlosti růstu kultury. Buňky mají lepší kontakt s médiem, tudíž je pro ně snadnější přijímat v něm rozpuštěné živiny, a proto dochází k výrazně rychlejšímu růstu i dělení.

Nevýhodou je ale vyšší náchylnost ke genetickým změnám a postupné pozbývání morfogenní schopnosti. Ve staré suspenzní kultuře vznikají heterogenity typu geneticky pozměněných buněk či protáhlých buněk vyplněných vakuolou, které zcela pozbyly schopnosti dělení. [24]

### 3.2.6 Kultivační zařízení [22]

Pro kultivaci různých typů buněk (rostlinných, živočišných nebo kultivaci mikroorganismů) používáme na základě jejich specifikací a nároků různá kultivační zařízení. Rostlinné buňky jsou se svými požadavky na asepsi asi někde uprostřed mezi nároky živočišných buněk a mikroorganismů.

Kultivace v laboratorních podmínkách probíhá nejčastěji v Erlenmayerových či varných baňkách o malém objemu (do 500 ml). Baňky jsou uzavřeny před okolním kontaminujícím prostředím hliníkovou fólií. Po naplnění živnou půdou dochází ke sterilizaci.

Vzdušnění a míchání je důležitá podstata hlavně pro suspenzní kultury. Je důležité, aby ke každé jednotlivé buňce byl zajištěn přístup kyslíku a živin, nesedaly na dno a neshlukovaly se, tedy aby bylo zachováno sdílení tepla a hmoty. Nejschůdnějším postupem míchání suspenzních kultur rostlinných buněk je, kvůli vysoké zdánlivé viskozitě a velké náchylnosti ke střížným silám, použití rollerů či reciprokových třepacích strojů.

### 3.2.7 Vnější a vnitřní faktory kultivace

Pro kultivaci rostlinných explantátů je nutno zajistit optimální podmínky (biologické, chemické a fyzikální). Jedná se zejména o světlo, teplotu, pH a přísun kyslíku, které taktéž významně ovlivňují produkci a akumulaci sekundárních metabolitů. [22]

#### 3.2.7.1 Vnější faktory

##### 3.2.7.1.1 Teplota [22,25]

Obecné teplotní optimum pro buněčné kultury se pohybuje mezi 17–25 °C. Ovšem i tato veličina je pro spoustu rostlinných druhů specifická a optimální teplota se tak pohybuje od 16–32 °C.

##### 3.2.7.1.2 Osvit [22,25]

Intenzita a přísun světla rovněž ovlivňuje koncentraci řady produktů. Od tohoto se odvíjí i skutečnost, zda se bude jednat o kulturu heterotrofní, fotomixotrofní či autotrofní. Změnou podmínek osvitů lze pak mezi těmito variantami kultur přecházet.

##### 3.2.7.1.3 Přísun kyslíku [25]

Je nutné zajišťovat i vhodné vzdušnění a míchání, zejména ve velkých bioreaktorech. I tato skutečnost ovlivňuje produkci sekundárních metabolitů.

##### 3.2.7.1.4 pH prostředí a osmotický tlak [25,26]

Vhodné pH média se pohybuje mezi 5 až 6, ovšem tato hodnota se během kultivace mění v závislosti na využívání či vypouštění amonných kationtů. Zároveň možnost buněk existovat ve vitálním stavu musí podpořit i správné osmotické parametry.

### 3.2.7.2 Vnitřní faktory [23]

Kultivační médium nutně obsahuje všechny esenciální makroelementy a mikroelementy, sacharidy, vitamíny, aminokyseliny a další nezbytné suroviny, například fytohormony či jejich chemická analoga, které řídí a podporují růst určitých částí rostliny. Poměr těchto složek v kultivačním médiu tak definuje vnitřní faktory kultivace.

### 3.2.8 Složení kultivačního média

Nejdůležitějším základem média je samozřejmě voda, která tvoří většinu rostlinného těla, a je zásadní pro transport živin a minerálních látek. [23]

Na místě je i přítomnost sacharidů a polysacharidů jako výchozích struktur pro syntézu dalších látek. Základem pak jsou zejména glukóza a fruktóza. Slouží nejen jako zdroje uhlíku, důležitá je i jejich osmotická aktivita. [23,26]

Neméně významnou složkou jsou minerální látky. Tyto plní specifické úlohy. Jedná se o esenciální, tedy biogenní prvky. Vedle základních prvků jako jsou uhlík, vodík a kyslík se jedná i o další makrobiogenní prvky – dusík, draslík, vápník, hořčík, fosfor, síru, železo. Ovšem nepostradatelné jsou i prvky mikrobiogenní – chlór, bor, mangan, zinek, měď, nikl a molybden. Bez přítomnosti těchto prvků nemá rostlina možnost projít všemi vývojovými stádii a předčasně hyne. Avšak při nadměrné koncentraci zejména mikroelementů mohou být pro rostlinu toxické. Prvky jsou přijímány nejčastěji ve formě iontů difúzí. [23,26]

#### 3.2.8.1 Makrobiogenní prvky [23,26]

Tři základní stavební kameny veškerých živých organismů – uhlík, vodík a kyslík jsou podmínkou pro využití sluneční energie rostlinou a umožňují průběh fotosyntézy.

Uhlík rostlina přijímá ve formě oxidu uhličitého ze vzduchu nebo jako součást půdního roztoku.

Kyslík rostlina váže do organických sloučenin z oxidu uhličitého, získává ho štěpením vody jako vedlejší produkt fotosyntézy.

Vodík, potažmo vodíkový kation, je základním iontem pro výrobu energie  $H^+$ /ATPázou.

Dusík obsahují molekuly, které jsou součástí proteinových složek potřebných pro fotosyntézu (chlorofyl, kofaktory). Dále je součástí DNA, fytohormonů a některých sekundárních metabolitů. Organické sloučeniny dusíku jsou zastoupeny ve všech životních procesech rostlin. Mají funkci stavební, metabolickou, transportní i zásobní. Příjem je zajištěn buď ve formě amonných či dusičných iontů nebo ve formě aminokyselin.

Draslík rostlina skladuje v nestabilních organických komplexech, ze kterých ho lze v případě nutnosti snadno vyvázat. Podílí se zejména na udržení nitrobuněčného turgoru a osmotické rovnováhy. Jeho role je pro toto nezastupitelná. Je nezbytný také pro hydrataci a konformaci enzymů, tím se nepřímě podílí na metabolických procesech.

Vápník předně vytváří důležité komplexy s kalmodulinem, které ovlivňují činnosti fosfatáz a kináz (někdy toto ovlivňuje vápenatý iont sám), dále pak transkripčních faktorů. Sám vápník je také důležitý iont zajišťující homeostázu a osmotický tlak buňky. Nesmí být opomenuta ani funkce vápenatých iontů jako tzv. druhých posílů, které jsou nezbytné pro přenos buněčných signálů.

Hořčík je strukturně vázán v chlorofylu, kdy podmiňuje jeho interakci během fotosyntézy. Jeho přítomnost je zároveň důležitá pro správnou stavbu ribozomů, a tak zajišťuje syntézu proteinů. Dále funguje jako aktivátor určitých enzymů podílejících se zejména na metabolismu sacharidů. Pomáhá stabilizovat i struktury nukleových kyselin.

Fosfor je důležitý jak v organické, tak anorganické formě. V obou případech pro syntézu či uvolnění energie. Je důležitým stavebním kamenem pro syntézu nukleových kyselin. Fosfát je součástí i fosfolipidových membrán. Zajišťuje též přenos signálu na vnitrobuněčnou i mezibuněčnou úroveň.

Síra společně se železem jsou důležitými činiteli v procesu přenosu elektronu v tmavé fázi fotosyntézy. Síra je taktéž nedílnou součástí některých aminokyselin, zejména cysteinu, díky němuž lze vytvářet a rušit disulfidické můstky. V důsledku těchto procesů se tak řídí enzymatické pochody a děje. Nemalý význam mají disulfidické můstky i v konformaci a potažmo tak i funkci proteinů. Cystein je výchozí látka pro další

nepostradatelné struktury (koenzymy, methionin, vitamíny) a některé sekundární metabolity.

Železo přenáší během fotosyntézy elektron v cytochromovém komplexu na vnitřní membráně mitochondrie. Je taktéž i součástí důležitých enzymů jak pro syntézu sekundárních metabolitů, tak pro detoxikační funkce rostliny.

### 3.2.8.2 Mikrobiogenní prvky [23,26]

Chlór společně s ionty vápníku stabilizuje komplex rozkládající vodu asociovaný s fotosystémem II v chloroplastu. Zároveň ve spolupráci s draselnými ionty upravuje osmotický tlak uvnitř buněk. V procesu fotosyntézy nesmí chybět ani atomy mědi a manganu.

Bór je jediný prvek, který rostlina přijímá v neiontové formě. Jeho nezbytnost spočívá v tom, že podmiňuje správnou funkci a stavbu buněčných stěn a plazmatické membrány, kdy v důsledku správné stavby a pevnosti stavebních složek ovlivňuje výslednou strukturu. Jeho dostatečný přísun hraje roli ve správném fungování metabolismu sacharidů, bílkovin a hospodaření s dusíkem.

Mangan tvoří součásti důležitých enzymů i procesů – superoxidodismutáz, RNAPolymeráz, fotosyntézy a Krebsova cyklu. Ovlivňuje i metabolismus dusíku. Částečně se mohou vzájemně zastupovat s hořčnatým kationtem. Je ale žádoucí, aby jeho hladiny v rostlině zůstávaly nízké.

Zinek tvoří základ struktur tak zvaných zinkových prstů či zinkových klastrů, které vytváří transkripční faktory a další regulační či transportní proteiny. Zastupuje i funkci katalytickou. Naopak podmiňuje například syntézu tryptofanu.

Měď velmi snadno přijímá a uvolňuje elektron, což je zásadní pro oxidačně redukční reakce probíhající při fotosyntéze. Slouží jako prostředek detoxikace, kdy chrání nenasycené mastné kyseliny před oxidací. Stabilizuje i molekuly chlorofylů.

Nikl je důležitý zejména pro hydrolytické děje, kdy svou vazbou ovlivňuje aktivitu enzymů. Hraje taktéž významnou roli v metabolismu dusíku.

Molybden rostlina využívá jako kofaktor enzymů spouštějících redoxní reakce. Ovlivňuje i metabolismus dusíku a síry.

Na okraj esenciálních prvků řadíme též selen. Rozlišujeme i prvky benefiční, tedy ty, které stimulují růst, avšak nejsou existenčně nezbytné. Jedná se zejména o sodík, křemík a kobalt. Ten stojí zejména za katalytickými ději.

### 3.2.8.3 Fytohormony

Patří mezi organické nízkomolekulární látky, které fungují jako endogenní signální molekuly. V rostlině se vyskytují ve velmi malém množství a zajišťují přenos informace na krátké i dlouhé vzdálenosti. Vyvolávají pleiotropní odpovědi, jejichž efekt a intenzita se odvíjí od schopnosti reakce a dešifrování signálu každé jednotlivé buňky. Dále pak na jejich koncentraci, rychlosti syntézy a odbourání hormonu či rychlosti přenosu v buňce. Účinek se projeví vyvoláním změny genové exprese.

Je možné působení těchto hormonů modulovat či simulovat pomocí chemicky syntetizovaných molekul. Tyto ovlivňují transport pravých fytohormonů nebo jejich funkci napodobují. Označujeme je pak jako růstové regulátory či morforegulátory.

Rozdělují se do 5 základních skupin na základě chemické struktury. Jedná se o auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou a etylén. V současnosti se rozlišují i některé další strukturní typy. [23]

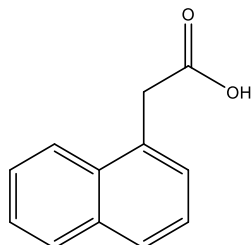
#### 3.2.8.3.1 Auxiny

Tyto strukturní typy fytohormonů vyvolávají především prodlužování buněk. Zařazujeme sem kyselinu indolyl-3-octovou (IAA), kyselinu indolyl-3-máselnou (IBA), kyselinu 4-chlorindolyl-3-octovou a kyselinu fenyl-octovou (PAA) a jejich další strukturní analoga, např. kyselinu  $\alpha$ -naftyl-octovou. [23]

Vliv auxinu na prodlužování buněk hraje mimo jiné významnou roli v pohybových reakcích. V neposlední řadě stimuluje tvorbu laterálních i adventivních kořenů, stejně tak diferenciaci vodivých pletiv a aktivitu kambia. Oddalují opad listů a podílí se i na vývoji a růstu plodů. Vyvolání buněčné odpovědi je zprostředkováno

ovlivněním exprese genů. [23] Vyšší koncentrace IAA zpětně inhibuje nadprodukcii etylénu. [26]

Obr. 6: Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová [27]



#### 3.2.8.3.2 Cytokininy

Hlavním úkolem cytokininů je zprostředkovávat dělení buněk (cytokinezi). S tím souvisí i podpora syntézy DNA. [23,26] Základní strukturní typ cytokinu se nazývá zeatin. Jedná se o substituovaný aminopurin v pozici N<sub>6</sub> pětiuhlíkatým řetězcem, v němž se vyskytuje 1 dvojná vazba. Obě formy *cis* a *trans* jsou biologicky účinné, avšak forma *trans* vykazuje vyšší aktivitu. Od této struktury se odvozují i cytokininy dihydrozeatin (DZ) a izopentenyladenin (iP). Aminopurinové jádro může být i substituováno derivovaným benzenovým jádrem (benzyladenin, 3-hydroxybenzyladenin) či jiným heterocyklem (kinetin).

Mezi úkoly plněné cytokininy patří vytvoření celkového vzhledu rostliny, zvětšují plochu listů, ovlivňují transport v rostlině a diferenciaci vodivých pletiv. Dále se pak podílí na diferenciaci chloroplastů, oddalují opad listů a stabilizují thylakoidy. [23] Jako jediný typ fytohormonů se přímo podílí na proteosyntéze. Navazují spolupráci a interakci zejména s auxiny. Používají se v kultivačních médiích na podporu růstu a při morfogenezi tkáňových kultur. Společně umožňují regenerační proces *in vitro* (při jejich vyrovnané koncentraci se utváří kalusová kultura). [26]

#### 3.2.8.3.3 Gibereliny

Jedná se o analoga kyseliny giberelové, jejíž struktura se odvozuje od diterpenů. 4 izoprenové jednotky vytvářejí giberelanový skelet o 4 základních cyklech. Hlavním cílem giberelinů je stimulace růstu stonku a listů skrze podporu růstu a dělení buněk. Jsou



zásadní pro klíčení semen a přechod z juvenilní fáze do fáze generativní. Dále svůj vliv uplatňují na vývoj pohlaví květů. Výsledný efekt je pak druhově podmíněný. Své působení uplatňují přes změny genové exprese. [23,26] Nejvíce aktivní ze všech je kyselina gibberelová 3 (GBA 3). [28]

#### 3.2.8.3.4 Kyselina abscisová [23]

Tento fytohormon je svým působením protipólem auxinů, cytokininů i gibberelinů. Jejím hlavním úkolem je z dlouhodobého pohledu řízení růstu a vývoje rostlin. Uplatňuje se ale i při reakci na aktuální stresovou situaci, zejména při snížené dostupnosti vody. Reguluje spuštění a průběh dormance semen i pupenů. U vybraných rostlinných druhů má kyselina abscisová za úkol senescenci a abscisi listů či jiných částí rostlin. Zasahuje podobně jako ostatní fytohormony do exprese genů, zvláště do jejich transkripce.

#### 3.2.8.3.5 Etylén

Hydrofobní plyn etylén, stejně jako kyselina abscisová, reguluje zejména senescenci a opad listů, dozrávání hlavně dužnatých plodů a figuruje v dějích při zvládnutí stresu a poranění. Taktéž zkracuje dormanci semen. I tento plyn uplatňuje své působení skrze změnu genové exprese. [23] Jeho transport zajišťuje prekurzor, jímž je kyselina aminocyklopropankarboxylová. Chemicky připraveným analogem prekurzoru je například kyselina 2-chlorethylfosfonová (CEPA).

Jeho produkci v pletivech podporují auxiny. Zvýšená koncentrace etylénu následně inhibuje další syntézu auxinů. [26]

#### 3.2.8.3.6 Další fytohormony [23]

Dalšími látkami upravující buněčné pochody jsou brassinosteroidy, jasmonáty, polyaminy, oligosachariny a systemin. Jejich aktivita a funkce se projevuje zejména v reakci na stres.

#### 3.2.8.4 Další složky média [24]

##### 3.2.8.4.1 Vitamíny

Jsou nezbytné pro růst a vývoj, neboť katalyzují metabolické procesy. Zejména se jedná o thiamin, kyselinu nikotinovou, pyridoxin a myo-inositol. To je sacharid, který účinně stimuluje růst explantátů. Pravděpodobně se totiž podílí na tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které jsou důležité při buněčném dělení.

##### 3.2.8.4.2 Aminokyseliny

Mají význam jako bezprostřední zdroj organického dusíku. Jejich přítomnost účinně stimuluje buněčný růst. Pokud ale koncentrace překročí určitou mez, je jejich vliv spíše inhibiční. Používají se L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin. S výhodou lze použít i směs aminokyselin, např. kasein-hydrolyzát.

##### 3.2.8.4.3 Nedefinované organické složky média

Přidávají se pro stimulaci růstu kultury. Jedná se o proteinové hydrolyzáty, kokosové mléko, kvasniční, sladový či banánový extrakt, pomerančovou nebo rajčatovou šťávu. Z hlediska bezpečnosti je však lepší tyto nedefinované látky nepoužívat.

V některých případech je možno využít i aktivní uhlí, např. pro navázání a odstranění toxických fenolických sloučenin, které se projevují hnědnutím tkáňové kultury či média.

Existuje vícero druhů definovaných kultivačních médií. Nejznámější a zároveň nejvíce používaná jsou média, která vyvinuli White, Murashige a Skoog, Gamborg et al., Gautheret, Shenk a Hildebrandt a další. [24]

### 3.2.9 Sterilizace kultivačního média a zařízení

Sterilizace může probíhat několika způsoby – zahříváním, filtrací, ozářením, ultrazvukem a chemicky. Nejčastěji je využívána sterilizace horkem, avšak teplota páry musí splňovat dvě podmínky. Za prvé její teplota a čas působení musí být dostatečné tak, aby došlo k usmrcení všech kontaminujících mikroorganismů i odolných spór. Zároveň však nesmí být natolik destruktivní, aby znehodnotila nutriční potenciál použitých surovin. [22] Mohlo by dojít k rozkladu sacharidů, proteinů, některých vitamínů a aminokyselin. [24]

Závisí i na velikosti použitého tlaku, kterým se docílí zvýšené teploty. Neměl by přesáhnout 140 kPa. Doba sterilizace se odvíjí od objemu sterilizovaného média v jednotlivých nádobách. Je proto výhodné sterilizovat médium rozdělené do několika nádob menšího objemu než velké množství najednou. Nejenže je sterilizace provedená tímto způsobem méně náročná na čas, zabrání se tím i nepříznivým účinkům dlouhotrvající vysoké teploty na složky média. [24]

Pro optimální dosažení výsledků je vhodné použít sterilizační cyklus, kdy se z kultivační teploty určitou dobu dosahuje cílové teploty (v parním autoklávu je tímto cílem 125 °C), která je udržena po dobu asi 20 až 30 min, a následně se teplota sníží zpět na kultivační teplotu. [22]

V případě přítomnosti termolabilních látek v kultivačním médiu lze s výhodou využít sterilizaci filtrací. Ostatní typy sterilizace se využívají spíše minoritně. [22]

Sterilitu práce i sterilitu prostředí je nutno zachovávat v každém kroku kultivace explantátu. Při nedodržení této podmínky jsou kultury velmi lehce napadnutelné plísněmi či bakteriemi, pro které je složení média velmi příhodné, a svým růstem rostlinou kulturu zničí. [24]

### 3.3 Využití explantátových kultur

#### 3.3.1 Fytofarmaka [22]

Nároky na dostatečné množství fytofarmak, tedy rostlinných produktů sloužících jako léčiva, jsou natolik vysoké, že je nutno získávat je i alternativními způsoby, než je původní pěstování léčivých rostlin. Explantátové kultury poskytují i mnoho výhod, díky kterým jsou v dnešní době hojně využívány. Jedná se na příklad o fakt, že je možné, díky využití explantátových kultur, získávat rostlinné produkty za řízených podmínek bez ohledu na počasí, roční období či půdu. Navíc jsou produkty homogenní a bez příměsí nečistot pocházející z hnojení, postřiků či přítomnosti hmyzu. Nemalý význam má i to, že z explantátových kultur je snadnější produkt izolovat než z rostlin, v nichž se tyto konkrétní látky nachází. V některých případech také získáváme vyšší výtěžky, než je možno získat klasickou cestou z mateřské rostliny. Jedná se zejména o produkci alkaloidů a prekurzorů hormonů.

#### 3.3.2 Strukturní obměny léčiva

Další význam explantátových kultur spočívá ve schopnosti rostlinných buněk provádět některé modifikace chemické struktury tak, že by to pomocí chemického postupu bylo buď velmi obtížné nebo zcela nereálné. Jedná se zejména o procesy glykozylace a hydroxylace, které se prakticky používají. [22] Je možné využívat i reakce redukční, oxidační, esterifikační, metylační a demetylační, epoxidační a acetylační. Důležité je i připomenout schopnost rostlin vytvářet stereospecifické izomery požadovaných molekul z celkově levných prekurzorů, anebo látky stereochemicky modifikovat. [25]

#### 3.3.3 Transgenní rostliny a jejich využití

Transgenní rostliny, získané pomocí rostlinných biotechnologií, jsou v současné době považovány za ekonomicky výhodný zdroj proteinů, které nejsou původním rostlinám vlastní. Jedná se zejména o rekombinantní protilátky a fragmenty protilátek, enzymy, hormony či proteiny deaktivující ribozomy. Protilátky získané z těchto kultur

jsou levnější díky surovinám i snadnějšímu procesu čištění oproti savčím kulturám. Za zmínku stojí i potenciální bezpečnost z hlediska přítomnosti patogenů, kdy rostlinné patogeny na rozdíl od patogenů napadajících živočišné buňky nejsou pro člověka nebezpečné. Navíc je možné produkovat proteiny v plné délce. V této oblasti stále probíhá intenzivní výzkum. [25]

Průlomová je i možnost výroby vakcín, zcela specificky pak výroba jedlých vakcín. Touto problematikou je ale nutno se ještě zabývat natolik, aby se mohlo docílit bezpečného a účinného dávkování pacientům. [25]

Pomocí této metody se získávají látky využitelné nejen ve farmacii ale i v potravinářství. Stojí také za vznikem nových potravin s upravenými a vylepšenými vlastnostmi – jablek, řepky, brambor a kávy. [22]

#### 3.3.3.1 Kryoprezervace [24]

Po získání nového rostlinného genofondu je potřeba uchovat ho tak, aby náhodnou nebo cílenou změnou genetické informace, která by zapříčinila snížení výnosu či změnu požadovaného produktu, nedošlo ke ztrátě produkční linie a bylo možné vrátit se k původně výchozímu bodu. Zajišťuje se to tzv. kryoprezervací, tedy zmrazením rostlinného materiálu a jeho uskladněním při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lze takto uchovávat nejen semena ale i rostlinná pletiva. Nutné je použití kryoprotektivních látek, které chrání buňky před nežádoucím vznikem ledových krystalů, jež by mohly rostlinný materiál nevratně poškodit.

#### 3.3.4 Mikropropagace rostlin

Neopomenutelný význam má i mikropropagace rostlin, tedy explantátovými kulturami zprostředkované vegetativní rozmnožování rostlin. Přednosti této metody spočívají v její nenáročnosti na prostor, proveditelnosti v jakémkoli čase či ročním období a minimální náročnosti na péči v období růstu buněk mezi pasážemi. Navíc probíhá za sterilních podmínek, a tím se usnadňuje vegetativní množení u těch rostlinných druhů, u nichž je klasický styl obtížný. Stinnou stránkou je však drahé laboratorní zařízení a poměrně vysoká pracnost metody. [22]

Během tohoto procesu je také možné ozdravení materiálu a zbavení ho patogenů aplikací virostatik či antibiotik. Díky explantátovým kulturám je i zjednodušen proces šlechtění a rozmnožování rostlin. [23]

### 3.3.5 Zvýšení produkce sekundárních metabolitů

Alfou a omegou tohoto počínání je složení kultivačního média. To by mělo optimálně pokrýt potřeby kultivovaných buněk, zároveň by však náklady na přípravu měly být v reálných možnostech ceny produktu. [22] Jedná se zejména o množství živin a přítomnost regulátorů růstu. Správný typ a poměr růstových regulátorů (zejména cytokininů a auxinů) má zásadní vliv na růst a produkci buněčných linií. V mnohých případech se pro její pozorovatelné zvýšení osvědčilo přidání prekursoru produktu. Lze použít i meziprodukt, který je součástí předpokládané chemické syntézy. [25]

Dalším důležitým bodem jsou náklady na izolaci produktu, které nemohou dosahovat příliš vysokých hranic. Problematika izolace se odvíjí od toho, že produkt je velmi často přítomen v poměrně malém množství ve vodném prostředí, kde jsou rozpuštěné i další látky. Obvykle je potřeba oddělit pevnou a kapalnou fázi kultury. Následuje buď vyluhování (získávání produktu ze systému pevná látka-kapalina) či extrakcí (získávání produktu ze systému kapalina-kapalina). Dalšími způsoby jsou adsorpce, krystalizace, membránová separace či chromatografické oddělení. [22]

#### 3.3.5.1 Elicitace

Elicitace vychází z principu, že rostliny syntetizují sekundární metabolity jako prostředek ochrany proti patogenům či jiným potenciálním stresorům a zajistily si tak konkurenceschopnost, odolnost a přežití. [25,29]

Při působení stresu na rostlinu existují 2 cesty, které mohou vyústit buď v adaptaci rostliny či v její programované smrti. Pokud rostlina začne využívat aktivních obranných mechanismů, vyvolá tak stresovou reakci. [23,26]

### 3.3.5.2 Elicitory

Elicitory tedy slouží jako stresové faktory. Přidávají se ke kulturám jen v malém stopovém množství. V reakci na ně pak rostliny aktivují biosyntetické dráhy ochranných látek. Tím je docíleno zvýšené syntézy a tím pádem i koncentrace kýženého produktu za kratší časový úsek.

Lze je klasifikovat jako biotické a abiotické, jako exogenní a endogenní. [25,29]

#### 3.3.5.2.1 Abiotické elicitory [23,29]

Abiotické nepochází z živé přírody. Jsou to buď anorganické soli či fyzikální činitelé. Například se jedná o ionty mědi, kadmia a vápníku, vysoké pH, nedostatek vody, kyslíku či minerálů, působení UV záření nebo větru, cykly zmrazování a rozmrazování, neesenciální součásti médií (agaróza), těžké kovy a chemikálie (kupříkladu látky vážící se na DNA, porušující funkci buněčné membrány – detergenty, látky s fungicidní či herbicidní aktivitou).

#### 3.3.5.2.2 Biotické elicitory [23,25,29]

Biotické elicitory pocházejí ze skupiny organických sloučenin. Jsou to tedy například polysacharidy typu pektin, celulóza, chitin či glukany, glykoproteiny či intracelulární proteiny, které slouží jako aktivátory enzymů nebo iontových kanálů. Vyskytují se buď přímým působením mikroorganismů (bakterií, hub a kvasinek) na rostlinu, nebo to jsou obranné látky rostlin proti mikroorganismům, živočichům nebo přítomnosti jiné rostliny.

#### 3.3.5.2.3 Exogenní a endogenní elicitory [29]

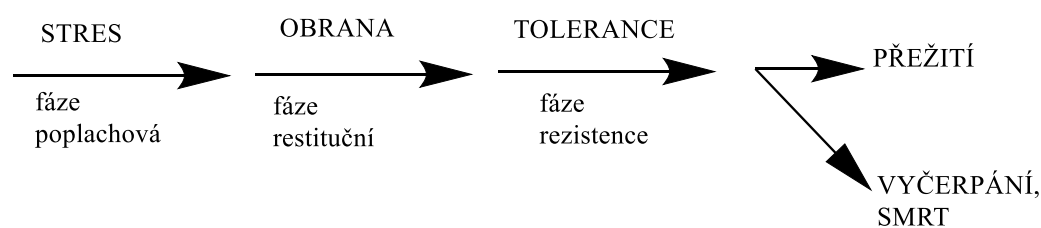
Exogenní elicitory se v běžném stavu nacházejí mimo buňku včetně reakce, která na ně odpovídá buď okamžitě, nebo prostřednictvím endogenních mediátorů. Řadí se sem polysacharidy (glukomanóza, glukany, chitosan), polyaminy, peptidy (monilicolin, poly-L-lysin), glykoproteiny, enzymy (polygalakturunáza, endopolygalakturonová kyselá lyáza, celulóza) či mastné kyseliny (arachidonová, eikosapentanová).

Endogenní elicitory pocházejí z vnitřku buňky až jako sekundární reakce na signál biotické či abiotické povahy. Jsou to galakturonidy, hepta- $\beta$ -glukozidy či alginátové oligomery.

### 3.3.5.3 Stresová reakce

Reakce na stres probíhá v několika krocích. V první poplachové fázi se signál o hrozícím nebezpečí přenáší ve všech kompartmentech rostliny. V další restituční fázi vyvolává rostlina obrannou reakci, která ji pomůže tento stav překonat. Tím se dostává do fáze rezistence, kdy působící stresor organismus toleruje až do jeho odeznění. Alternativou je vyčerpání sil a smrt organismu. [23]

Obr. 7: Reakce na stres [23]



O úspěšnosti zvládnutí této náročné situace rozhoduje několik skutečností. Záleží na charakteru, délce, velikosti a rychlosti nástupu působení stresoru. Dále na parametrech rostliny, tedy na jejím genotypu, vývojovém stádiu a fyziologickém stavu. Nejčastější reakcí na probíhající stres je zastavení růstu. [23] Často současně rostlina začne stimulovat produkci sekundárních metabolitů na úkor omezení primárního metabolismu tak, že společné prekurzory pro obě cesty rostlina přednostně využívá pro metabolismus sekundární. [24]

#### 3.3.5.3.1 Stresová reakce na buněčné úrovni [29]

Mechanismus obrany proti elicitorům není zcela objasněn. Do tohoto procesu se zřejmě zapojují vápenaté ionty jako sekundární poslové. Působí faktory, které ovlivňují integritu buňky či se aktivují nebo naopak inhibují intracelulárně probíhající procesy nebo osmotické poměry. Toho je docíleno možnou vazbou elicitoru na membránový receptor, někdy i náhlým zvýšením plazmatických hladin  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárního prostředí



a endoplazmatického retikula. Někteří vědci poukazují na rychlé změny ve fosforylaci související s aktivací proteinkináz.

Další teorií je snížení pH uvnitř buňky způsobené inaktivací  $H^+$ /ATPázy a zároveň zvýšením extracelulárního pH, s čímž souvisí pokles polarizace buněčné membrány. Jiná skupina vědců spojuje zvýšenou produkci ROS (superperoxidový aniont a peroxid vodíku) nejen s jejich antimikrobním působením, ale i se zvýšenou tvorbou bioaktivních derivátů mastných kyselin. Podobně byl pozorován účinek ROS na zesílení proteinů bohatých na prolin vázaných v buněčné stěně, kdy peroxid vodíku může sloužit jako sekundární posel pro transkripci obranných genů.

Jiné hypotézy hovoří o nahromadění obranných proteinů, které vyvolají uvolnění endogenních elicitorů, glykoproteinů bohatých na hydroxyprolin a inhibitorů proteáz. Byla pozorována i infekcí spuštěná hypersenzitivní reakce či aktivace genů pro syntézu obranných genů.

Pochopení souvislostí všech těchto mechanismů, jejich souslednost a návaznost je stále předmětem zkoumání. Navíc se jednotlivé obranné reakce mohou měnit v závislosti na původu, specifitě, koncentraci a délce působení stresoru, složení kultivačního média, přítomnosti regulátoru růstu, životních podmínkách, stáří buněk, schopností absorpce a podobně.

## 3.4 Pyridin

### 3.4.1 Základní popis [30]

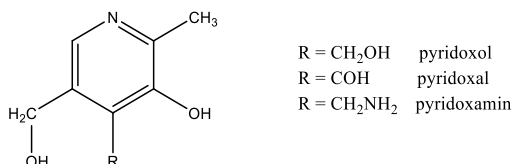
Tento heterocykl je za běžných podmínek charakterizován jako slabě bazická bezbarvá kapalina nepříjemného zápachu. Získává se z černouhelného dehtu, lze ho však připravit i syntézou, nejčastěji reakcí acetaldehydu, formaldehydu a amoniaku.

### 3.4.2 Výskyt

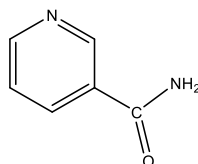
V přírodě se vyskytuje pouze omezeně. Byl izolován z kořenů i listů rulíku zlomocného (*Atropa belladonna*, Solanaceae), taktéž je základem alkaloidu nikotinu.

[9,30] Nachází se i mezi těkavými složkami černého čaje. Zjistila se jeho přítomnost v těkavých složkách vařeného hovězího masa, smaženého kuřete a slaniny či sýru. [32] Molekula pyridinu je i součástí vitamínu B<sub>6</sub> – pyridoxinu, vitamínu B<sub>3</sub> – nikotinamidu a kyseliny nikotinové, které jsou důležitou složkou reakcí využívajících NAD<sup>+</sup> a NADP<sup>+</sup> jako kofaktor. [31]

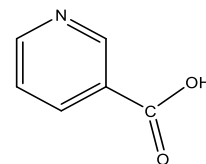
Obr. 8: Vitamin B<sub>6</sub> [32]



Obr. 9: Vitamin B<sub>3</sub> [33]



Obr. 10: Kyselina nikotinová [33]



### 3.4.3 Použití

Široce se využívá jako rozpouštědlo nejen v laboratorním měřítku, ale i v chemickém průmyslu. Cení se jako tzv. lapač kyselin. Ačkoliv jeho výpary mohou při nezachování podmínek bezpečnosti práce vyvolat toxické účinky na lidské zdraví, které se projevují jako bolest hlavy, nespavost, závratě či anorexie, je jeho použití jako aromatického adjuvans v potravinářství schváleno a považováno za bezpečné. Stal se důležitým meziproduktem v syntéze substituovaných pyridinů, piperidinů, agrochemikálií a léčiv. [30]

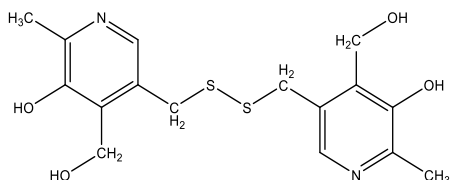
#### 3.4.3.1 Součást léčiv

Mezi léčiva, kde je pyridin součástí molekuly, patří například nootropikum pyritinol, inhibitory fosfodiesterázy amrinon a milrinon, hypolipidemikum etofibrát, inhibitory protonové pumpy (lansoprazol, pantoprazol, ...), projímadlo bisakodyl a další. [32,33]

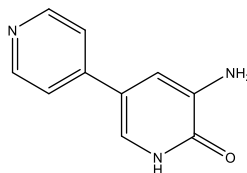
Významnou roli hraje pyridin jako farmakofor ve struktuře antituberkulotik. Je stavebním kamenem isoniazidu, jednoho ze 4 základních antituberkulotik, na něž bohužel stále roste rezistence. [34] Pyridin je farmakoforem, který je klíčový pro jeho nejdůležitější mechanismus účinku. Isoniazid inhibuje syntézu kyseliny mykolové, která působí neprostupnost buněčného obalu mykobakterií. Sám o sobě je proléčivem, které

musí být aktivováno enzymem katalázou-peroxidázou na isonikotinylový radikál, který pak vytváří kovalentní vazbu s NADH. Toto pak vede k vyčerpání koenzymu NAD<sup>+</sup>. [35] Proto v této skupině probíhá intenzivní výzkum, spočívající v objevu látky, která by si ponechala svou účinnost, zároveň však nepodléhala rezistenci. [34]

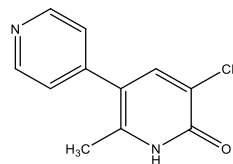
Obr.11: Pyritinol [32]



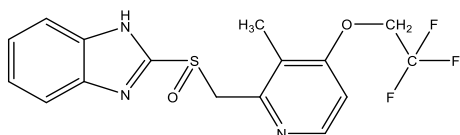
Obr. 12:  
Amrinon [33]



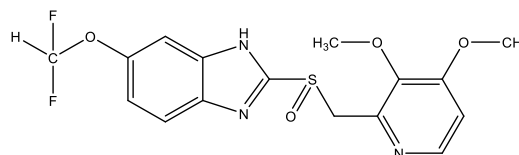
Obr. 13:  
Milrinon [33]



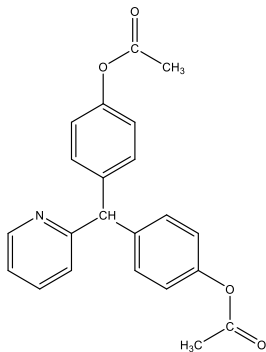
Obr.14: Lansoprazol [33]



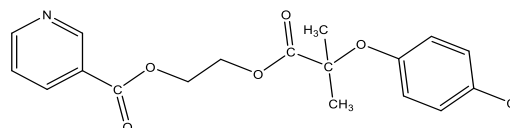
Obr. 15: Pantoprazol [33]



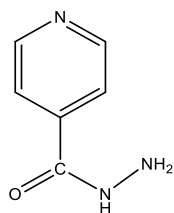
Obr.16: Bisakodyl [33]



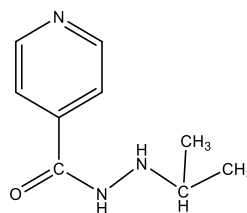
Obr. 17: Etofibrát [33]



Obr. 18: Isoniazid [36]



Obr. 19: Iproniazid [36]



#### 3.4.4 Elicitační účinky

Chemicky připravené látky, které po působení v explantátové kultuře rostlinných buněk vyvolaly zvýšenou produkci sekundárních metabolitů, jsou svou strukturou mezi sebou velmi rozmanité. Pokud je v molekule zkoušené látky přítomen pyridinový či pyrazinový heterocykl, je velká pravděpodobnost, že dokáže působit jak silný elicitor. Potvrzuje to mnoho studií.

Chlorované pyridiny, lépe řečeno chlorované deriváty kyseliny isonikotinové, se prokázaly jako velmi slibné elicitory v kultuře *Taxus chinensis*, kdy docílily zvýšení produkce taxuyunnaninu C. [37]

Účinek 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothiamidu jako nadějného elicitoru byl potvrzen i ve studii v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L., kdy zvýšil koncentraci flavonoidů genisteinu i dadzeinu až o 400 % oproti kontrolní skupině. [38]

Stejná sloučenina vyvolala v odlišné práci nárůst produkce v suspenzní kultuře dvou různých variet jetele lučního, především však byla úspěšná v nízkoprodukční varietě Tempus, kdy se po 48 hodinách koncentrace flavonoidů zvýšila o 438 %. [39]

Zvýšená produkce flavonoidu taxifolinu a flavonolignanů silymarinu i jeho součástí silychristinu byla zaznamenána v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn, kdy byla kultura elicítována substituovanými pyrazin-2-karboxamidy (*N*-(3-jodo-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamidem a *N*-(3-jodo-4-methylfenyl)-5-terc-butyl-pyrazin-2-karboxamidem). [40]

V diplomové práci zabývající se podobnou tematikou byl jako elicitor zkoušen derivát pyrazinu (2,4,6-trimethyl-*N*-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamid) v kalusové i suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L., kde stoupla produkce rutinu v obou typech kultur. Došlo také ke zvýšení hladiny hyperosidu po působení elicitoru v kalusové kultuře. [41]

### 3.4.5 Pyridinbenzamidy

#### 3.4.5.1 Obecné vlastnosti

Benzamid je bílá, pevná, krystalická látka, která se mírně rozpouští ve vodě, ale je velmi dobře rozpustná v mnoha organických rozpouštědlech. Existuje nepřeberné množství substituovaných benzamidů. [42]

Skupina pyridinbenzamidů je velmi rozmanitá. Obecně lze říct, že to jsou látky běžně se vyskytující v pevném skupenství, ve většině případů se jedná o bílý krystalický prášek. Převážně se získávají chemickou syntézou. [43]

#### 3.4.5.2 Biologické účinky

Většinou to jsou dráždivé látky, které mohou vyvolat iritaci jak na kůži, tak i závažné poškození očí (např. *N*-(pyridin-4-yl)benzamid, 4-amino-*N*-(pyridin-2-yl)benzamid). Vykazují širokou paletu biologických aktivit, např. *N*-(pyridin-4-yl)benzamid inhibuje aktivitu tyrosin kinázy 2 (TYR 2) a janus kinázy 2 (JAK 1), 2,6-dichloro-*N*-(pyridin-4-yl)benzamid mimo inhibici TYR 2, JAK 1 a 2 a cytochromu CYP 3A4 ovlivňuje činnost i regulátoru transmembránové vodivosti cystické fibrózy (CFTR) a tyrosyl DNA fosfodiesterázy 1 (TDP1). [43]

Zajímavá je látka *N*-(pyridin-2-yl)benzamid, u které byla zjištěna antimikrobní aktivita proti *Trypanosoma brucei brucei* 427 po 48 h působení testu alamar blue. [43] Dále pak ve studii, která se zabývala deriváty *N*-(pyridin-2-yl)benzamidů, bylo dokázáno, že některé z nich alostericky modifikují aktivitu enzymu glukokinázy, který je klíčový pro utilizaci glukózy. Ve studii byly tyto sloučeniny testovány *in vitro*, *in silico* i *in vivo* a některé z nich skutečně snížily hladinu glukózy v krvi. Tím se mohou stát vedoucími molekulami pro novou generaci léčiv s hypoglykemickým účinkem pro terapii diabetu mellitu 2. typu. [44]

Prozkoumával se jejich inhibiční vliv na lidské enzymy aldosteron syntázu a nikotinamid fosforibosyltransferázu. Prověřeny byly i jejich schopnosti ohledně modulace buněčných receptorů – vanilloidního 1 či glutamátového mGlu5. Ověřovala se

jejich aktivita na poli kardiovaskulárních onemocnění, neuroprotektivity a léčby epilepsie, také účinnost proti vředům. [44]

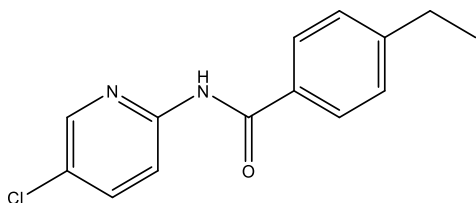
### 3.4.5.3 Antituberkulotická aktivita

Ve skupině substituovaných *N*-pyridinbenzamidů aktuálně probíhá intenzivní výzkum jejich antimykobakteriální aktivity. Bylo již připraveno mnoho látek odvozených od pyridinbenzamidů, některé z nich vykazovaly účinek proti mykobakteriím. [45]

#### 3.4.5.3.1 *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid

Elicitor zkoušený v této práci patří k nově nasyntetizovaným sloučeninám na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Jedná se o *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid. [46]

Obr. 20: *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid [46]



Znamé obecné vlastnosti: [46,47]

- Je to bílá, krystalická látka.
- Sumární vzorec – C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O
- Přesná molární hmotnost – 260,07 g/mol
- LogP – 3,68
- ClogP – 3,83736
- Teplota tání – 103–104,8 °C

Byl podroben spolu s dalšími strukturně podobnými látkami zkoumání ohledně jeho antituberkulotického potenciálu. Současně byl pozorován i jeho hepatotoxický účinek a doplňkově i vliv na vybrané bakteriální a houbové kmeny. Z této práce vyplývá:

- Tato látka je oproti ostatním zkoušeným sloučeninám i standardům (rifampicinu, isoniazidu a ciprofloxacinu) slabě antimykobakteriálně účinná. Její MIC (minimální inhibiční koncentrace) uvedená v jednotkách  $\mu\text{g/ml}$  byla pro kmen *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra stejně jako pro kmen *Mycobacterium aurum* 62,5; pro *Mycobacterium smegmatis* 31,25.
- Tato aktivita je nižší oproti předpokladu jejího optimálního logP, avšak patří mezi látky, které mají velmi široké spektrum účinku – prokázala inhibici růstu všech 3 testovaných mykobakteriálních kmenů.
- Současně neměla efekt proti testovaným bakteriálním a houbovým kmenům.
- Lze říct, že tato látka nemá hepatotoxické nežádoucí účinky, jelikož její IC 50 (poloviční maximální inhibiční koncentrace) při působení na hepatocelulární karcinom HepG2 byla nad hranicí  $50 \mu\text{M}$  –  $95,2 \mu\text{M}$ . [47]

Protože již v minulosti byly látky se strukturou podobnou antituberkulotikům či přímo s potvrzenou antituberkulotickou aktivitou používány jako elicitory k zvýšení produkce sekundárních metabolitů, bylo účelem mé práce zjistit, zda tomu tak bude i v tomto případě.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použitý materiál, přístroje a pomůcky

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

V této diplomové práci byly použity kalusové a suspenzní kultury z rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Byly získány z kořenové části klíčící rostliny. Pro experiment byla využita 76.–81. pasáž kalusové kultury a suspenzní kultury.

#### 4.1.2 Chemikálie

- Destilovaná voda č., Katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, ČR
- Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR
- Dusičnan draselný p.a., Lach-Ner, ČR
- Edetan sodný p.a., Sigma-Aldrich, USA
- Etanol 96% č., Lachema, ČR
- Glycin p.a., Penta, ČR
- Hydrolyzát kaseinu č., Imuna, SR
- Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lachema, ČR
- Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Penta, ČR
- Jodid draselný p. a., Lachema, ČR
- Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová č., Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR
- Kyselina nikotinová č., Lachema, ČR



- Metanol HPLC grade č., Merk, Německo
- Metanol p.a., Penta, ČR
- Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR
- Myo-inositol č., Fluka, Švýcarsko
- *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid č., FaF UK HK, ČR
- Pyridoxin č., Sigma-Aldrich, USA
- Sacharóza p.a., Lachema, ČR
- Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
- Síran manganatý monohydrát p.a., Lachema, ČR
- Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR
- Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
- Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR
- Standardy pro HPLC analýzu
  - Silymarin p.a., Sigma-Aldrich, USA
  - Taxifolin p.a., Sigma-Aldrich, USA
- Superčistá voda č., Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR
- Thiamin č., Sigma-Aldrich, USA

#### 4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy PRLT A13, Sartorius, Německo
- Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR
- Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Slovensko

- Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko
- Filtrační papír
- Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko
- Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan LtD, Lotyšsko
- Horkovzdušný sterilizátor Chirana SVS9/1, ČR
- Kolona Li Chrospher RP-18 250-4, sorbent Li Chrospher 5 $\mu$ m
- Laboratorní sklo a nádoby
- Mikrofiltry (0,20  $\mu$ m), Corning NY 14831, Německo
- Pipetovací balónek, Filip, Německo
- Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 $\mu$ m
- Sušárna HS 61A Chirana, ČR
- Termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko
- Těsnění na vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR
- Třepačka UNIMAX 2010, Heidolph Instruments, Německo
- Ultrazvuková lázeň, RX 255H Bandelin Sonorex, Německo
- Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR
- Vodní lázeň GFL, typ 1042, Německo

## **4.2 Průběh kultivace explantátových kultur**

### **4.2.1 Příprava kultivačních nádob a nástrojů**

Pro experimenty tohoto typu je vhodné využívat laboratorní sklo značky SIAL, díky jeho odolnosti a rezistenci vůči vysokým teplotám a působení chemikálií.

Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml (pro jeden cyklus elicitace jich bylo potřeba 35) je nutno před zahájením pokusu omýt horkou vodou se saponátem, opláchnout čistou pitnou vodou a následně i vodou destilovanou. Nakonec se dokonale vysuší v horkovzdušném sterilizátoru při 200 °C. Dalším krokem je v případě přípravy kultivačních nádob pro kalusové kultury vložení můstku z filtračního papíru pomocí pinzety.

Všechny nástroje a pomůcky byly pečlivě omyty 96% roztokem etanolu a následně vysterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru zabalené v hliníkové fólii. Otevřeny a používány byly až v čase potřeby přímo v laminárním boxu. Samotný box i celou oddělenou očkovací místnost bylo nutno minimálně 1 h před jeho využitím vysvětlit germicidní zářivkou. Alespoň 15 minut před zahájením práce v boxu se zapnulo laminární proudění, aby se za udanou dobu stihlo ustálit a nedocházelo k vířivému pohybu spojenému s kontaminací sterilního materiálu. Nakonec se vnitřek boxu pečlivě vytřel 96% etanolem.

#### 4.2.2 Příprava živných půd

Pro *in vitro* kultury ostropestřece mariánského byl použit nejrozšířenější typ živné půdy podle Murashigeho a Skooga (MS), který byl popsán již v roce 1962. Jeho doplněné složení pro účely pokusu je uvedeno níže: [48]

##### Makroelementy:

MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
KNO <sub>3</sub>	1900 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/l
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	440 mg/l

Mikroelementy:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/l
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	15,6 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	8,6 mg/l
NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,03 mg/l
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
KI	0,83 mg/l

Železnatý komplex:

FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3 mg/l

Vitamíny:

Thiamin	0,5 mg/l
Pyridoxin	0,5 mg/l
Kyselina nikotinová	0,05 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l

Organické sloučeniny:

Sacharóza	30 000 mg/l
Kasein-hydrolyzát	1 000 mg/l
Glycin	2 mg/l

### Růstový regulátor:

Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová      10 mg/l

Jelikož jednotlivé složky pro přípravu 1 l média jsou přítomny ve velmi malých množstvích a byla by tedy velká pravděpodobnost chyby při navážce, využívají se pro přípravu kultivační půdy zásobní roztoky připravené v dané koncentraci tak, aby byla příprava co nejsnadnější, nejrychlejší a nejpřesnější. Připravují se v odměrných baňkách většinou 10x až 100x koncentrované. Uchovávají se pouze omezenou dobu, většinou v chladu a temnu.

Byly použity zásobní roztoky makroelementů, mikroelementů, železnatého komplexu, vitamínů, glycinu a růstového stimulatoru, zředily se v 500 ml destilované vody v odměrné baňce o objemu 1000 ml. Následně se dovážila sacharóza, myo-inositol a hydrolyzát kaseinu. Po rozpuštění všech složek média se doplnil objem baňky po rysku a obsah se řádně promísil. Připravená živná půda se rozlila cca po 30 ml do každé z Erlenmeyrových baněk. Poté se dobře uzavřely hliníkovou fólií tak, aby byl zamezen vstup cizorodých látek. Poslední fází přípravy byla sterilizace nádob s médiem v autoklávu za teploty 121 °C a tlaku 100 kPa po dobu 15 minut.

#### 4.2.3 Pasážování kalusové kultury, odvození kultury suspenzní a jejich kultivace

Vychladlé baňky s vysterilizovaným médiem se před prací v laminárním boxu pečlivě oťřely 96% lihem. V boxu se následně pinzetou přeneslo inokulum (= část staré kultury z předchozí kultivace) o objemu cca 1 cm<sup>3</sup> do nové kultivační nádoby a usadilo se na filtrační můstek, po kterém vzlínalo médium. V případě suspenzní kultury se inokulum mechanicky rozměnilo o stěnu baňky. Používané vysterilizované pinzety se pravidelně měnily, aby se zabránilo kontaminaci. Takto připravené kultury se ihned opět uzavřely hliníkovou fólií a přenesly do kultivační místnosti, kde byly dodrženy standardní podmínky – teplota 25 °C a fotoperioda 16 h osvit/8 h tma. Kalusové kultury takto byly kultivovány 3–4 týdny. Suspenzní kultury se ihned po jejich založení umístily na třepačku (180 ot/min) a nechaly kultivovat 2–3 týdny.

## 4.3 Elicitace a průběh experimentu

### 4.3.1 Příprava roztoku elicitoru

Jako elicitor byla použita látka *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid. Její počáteční navážka činila 50 mg, která byla pečlivě navážena na analytických vahách. Následovalo její rozpouštění a ředění na požadované koncentrace:

$$C_1 = 50 \text{ mg}/50 \text{ ml} \quad (3,845 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l})$$

$$C_2 = 5 \text{ mg}/50 \text{ ml} \quad (3,845 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l})$$

$$C_3 = 0,5 \text{ mg}/50 \text{ ml} \quad (3,845 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$$

Koncentrace  $C_1$  byla získána rozpuštěním celé navážky kvantitativním přenosem do vysterilizované odměrné baňky o objemu 50 ml a přidáním 96% etanolu. Pro usnadnění rozpuštění byla baňka přenesena na ultrazvukovou lázeň, ve které se rozpustily menší shluky látky. Koncentrace  $C_2$  byla připravena odpipetováním 5 ml roztoku o koncentraci  $C_1$  sterilní pipetou a naředěním v 50ml odměrné baňce 96% etanolem. Analogicky byl naředěn i elicitor o koncentraci  $C_3$ , který byl získán ředěním 5 ml elicitoru o koncentraci  $C_2$  do konečného objemu 50 ml 96% etanolem.

Příprava elicitorů probíhala stejně jako přesazování kultur za sterilních podmínek v boxu s laminárním prouděním.

### 4.3.2 Elicitace

Přidávání elicitoru k rostlinným buňkám probíhalo v prostředí laminárního boxu po jeho předchozí přípravě a dodržení aseptických podmínek. Baňky s kulturami se opět vydezinfikovaly otřením roztokem 96% etanolu.

25 baněk sloužilo k poskytování informací o účinku elicitoru, 10 baněk bylo použito jako kontrolní vzorky. Ke kulturám byl přidán 1 ml elicitoru tak, aby nepřišel do přímého styku s buňkami, ale aby se smísil s médiem. Ke kontrolním skupinám byl napipetován pouze 1 ml 96% etanolu. Působení elicitoru bylo ukončeno ve stanovených intervalech po 6, 24, 48, 72 a 168 h vždy v 5 kultivačních nádobách. Kontrola byla

prováděna v časech 24 a 168 h taktéž z 5 baněk. Současně byla odebrána i část živného média od každého vzorku, které bylo uchovááno v mraznici pro následnou analýzu.

Kalusové kultury se po uplynutí doby elicitace vyndaly z baňky za pomoci pinzety na filtrační papír a nechaly se usušit za laboratorní teploty. Suspenzní kultury se přefiltrovaly na Büchnerově nálevce a nechaly se taktéž vyschnout při laboratorní teplotě.

Všechny vzorky se pečlivě označovaly a uchovávaly.

## **4.4 Stanovení obsahu flavonolignanů a taxifolinu**

### **4.4.1 Příprava vzorků k analýze**

Vzorky vysušených buněk kalusových i suspenzních kultur se rozmělnily a rozdrtily v třecí misce na jemný prášek a byly pečlivě zváženy na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa. Poté se kvantitativně přenesly do varných baněk, přidalo se k nim 10 ml 80% metanolu a nechaly se za varu extrahovat pod zpětným chladičem 10 min na vodní lázni. Následně byl horký extrakt zfiltrován přes smotek vaty do odměrné baňky o objemu 25 ml. Tento smotek se přidal k rozdrceným buňkám a s dalšími 10 ml 80% metanolu byla extrakce opakována opět po dobu 10 min. Filtráty byly spojeny a doplnily se 80% metanolem v odměrné baňce po rysku.

Odebíraná média se rozmrazila a nechala odpařit do sucha na vodní lázni. Zbylé odparky byly rozpuštěny v 10 ml 80% metanolu.

Asi 1,7 ml z každého metanolového extraktu se poté zfiltrovalo přes mikrofiltr (0,2  $\mu\text{m}$ ) do vialky a uzavřelo se víčkem. Všechny vzorky byly zanalyzovány metodou HPLC.

### **4.4.2 Princip a průběh analýzy**

Stanovení obsahu zkoumaných látek, tedy silymarinového komplexu a flavonoidu taxifolinu, probíhalo pomocí metody HPLC, tedy vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jedná se o velmi citlivou metodu, pomocí které lze najednou určit kvalitativní i kvantitativní složení zkoumaného vzorku. Její nespornou výhodou je vysoká

citlivost, která dokáže detekovat i velmi malá množství v malém objemu vzorku. Dále je její přednost poměrně krátká doba stanovení a možnost automatizace celé metody. [49]

Principem tohoto stanovení je rozdělení látek mezi fázi stacionární, umístěnou v koloně, a mobilní fázi, která touto kolonou prochází za vysokého tlaku. [50] Analyzované látky se buď zachytí na povrchu kolony (mechanicky, adsorpcí, ...), nebo se rozpouští ve fázi mobilní a tou jsou unášeny k detektoru. Hlavní charakteristikou každé takto analyzované látky je retenční čas, tedy doba trvání projití vzorku od nástřiku skrze kolonu až k detektoru. Jeho množství určujeme na základě výpočtu plochy pod píkem na zaznamenaném chromatogramu. Směrodatný pro kvalitu takto provedené analýzy je použitý detektor, od jehož detekční schopnosti se odvíjí citlivost a selektivita stanovení. [49]

HPLC analýza proběhla na chromatografické sestavě, která se skládá z autosampleru AS-2055 Jasco, čerpadla PU-2089 Jasco, předkolonového filtru, ochranné předkolony a kolony LiChrospher RP-18 250x4 (5  $\mu$ m). Na konci vzorky procházely spektrofotometrickým detektorem diodového pole MD-2015 Jasco, kde detekce probíhala v rozmezí vlnových délek 190–450 nm. Obsah pozorovaných látek byl vyhodnocen z píků získaných při vlnové délce 288 nm. Jednotlivý nástřik měl objem 20  $\mu$ l.

Eluce probíhala 2 eluenty (A – voda, B – metanol) v několika fázích. Nejprve gradientově, z 0% metanolu v čase  $t = 0$  do 50% metanolu v čase  $t = 5$  min. Na tuto fázi navázala izokratická eluce 50% metanolem do času  $t = 25$  min. V mobilní fázi musel být vždy přítomen pufr 0,15% kyseliny fosforečné. Rychlost průtoku čítala 1,4 ml/min. Celý tento proces probíhal za termostatem nastavené teploty kolony 25 °C.

Přesný obsah zkoumaných látek se určil metodou normalizace za použití vnějšího standardu. Porovnávaly se chromatogramy získané z jednotlivých vzorků s chromatogramem standardu silymarinu, který jasně popisuje jednotlivé píky a retenční časy složek silymarinového komplexu – silychristinu, silydianinu, silybinu A, silybinu B, isosilybinu A a isosilybinu B, a chromatogramem standardu taxifolinu. Pomocí vytvořené kalibrační křivky se následně vypočetl obsah těchto jednotlivých látek.



#### 4.4.3 Kalibrační křivky

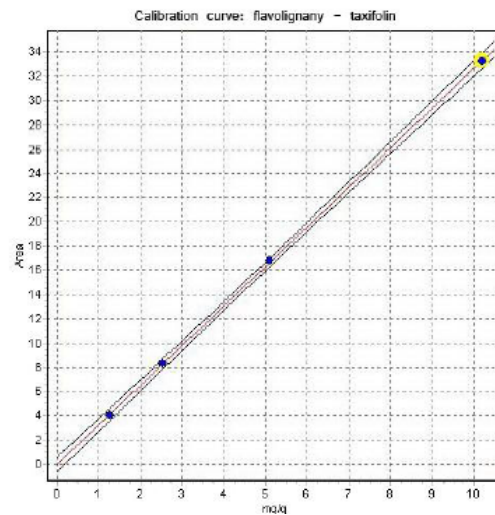
- Byly sestaveny podle rovnice  $y = bx + a$ .
- Hodnota  $y$  vyjadřuje plochu.
- Osa  $x$  vyjadřuje koncentraci zkoumané látky uvedenou v jednotkách mg/g vzorku.
- Člen  $a$  je vždy rovný 0.
- Člen  $b$  je různý pro jednotlivé typy sekundárních metabolitů.
- **Regresní koeficient** získaných kalibračních křivek musí být vyšší než 0,9900.

#### Kalibrační křivka taxifolinu

regresní koeficient: 0,9999

$$a = 0$$

$$b = 3,26361$$

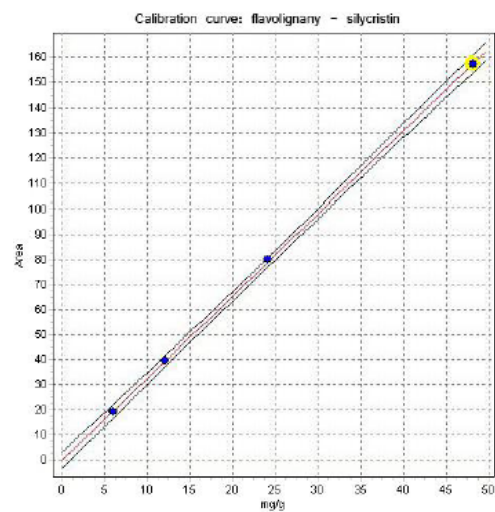


#### Kalibrační křivka silychristinu

regresní koeficient: 0,9999

$$a = 0$$

$$b = 3,26964$$

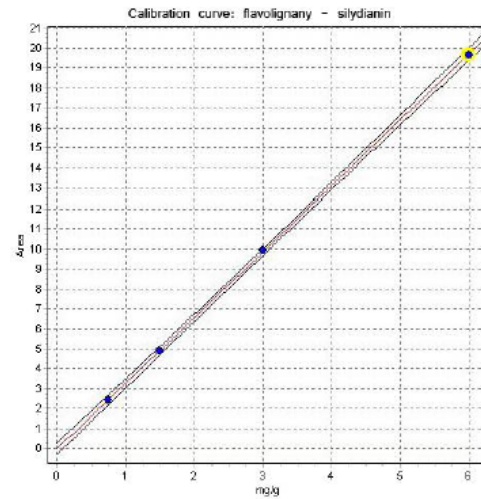


### Kalibrační křivka silydianinu

regresní koeficient: 0,9999

$$a = 0$$

$$b = 3,28186$$

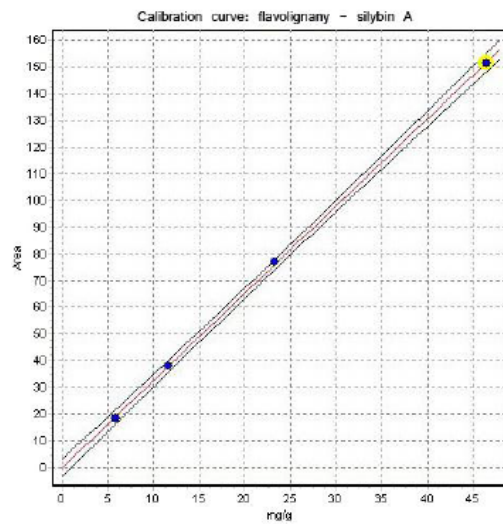


### Kalibrační křivka silybinu A

regresní koeficient: 0,9999

$$a = 0$$

$$b = 3,26609$$

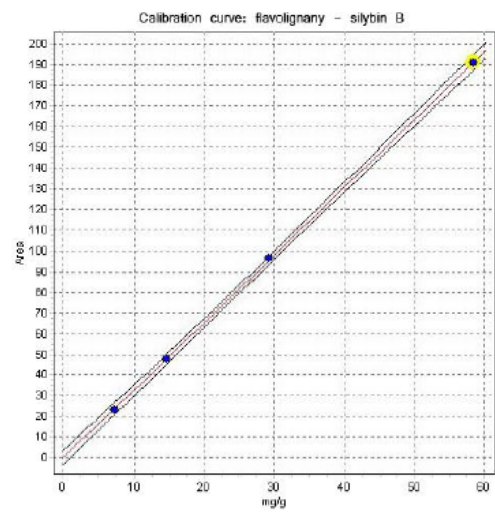


### Kalibrační křivka silybinu B

regresní koeficient: 0,9999

$$a = 0$$

$$b = 3,26957$$

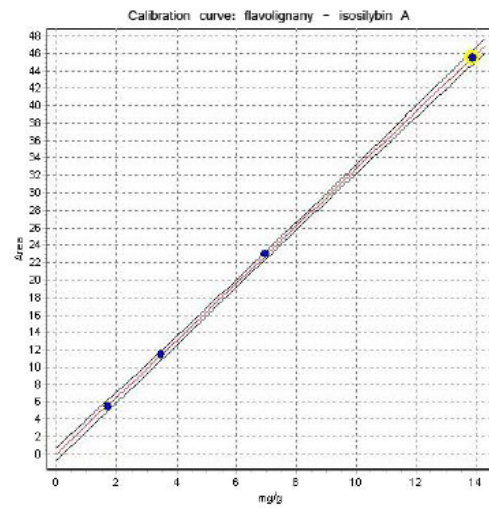


### Kalibrační křivka isosilybinu A

regresní koeficient: 0,9999

$$a = 0$$

$$b = 3,27665$$

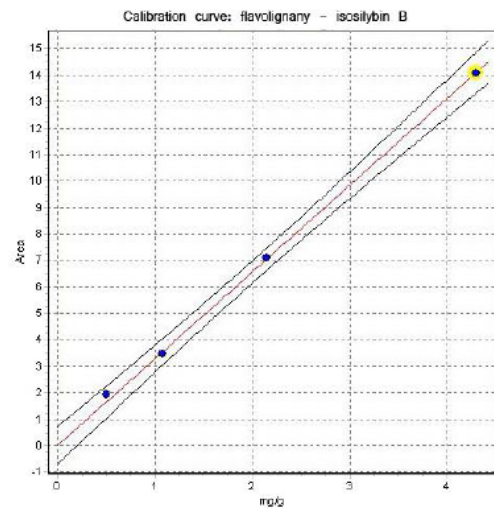


### Kalibrační křivka isosilybinu B

regresní koeficient: 0,9999

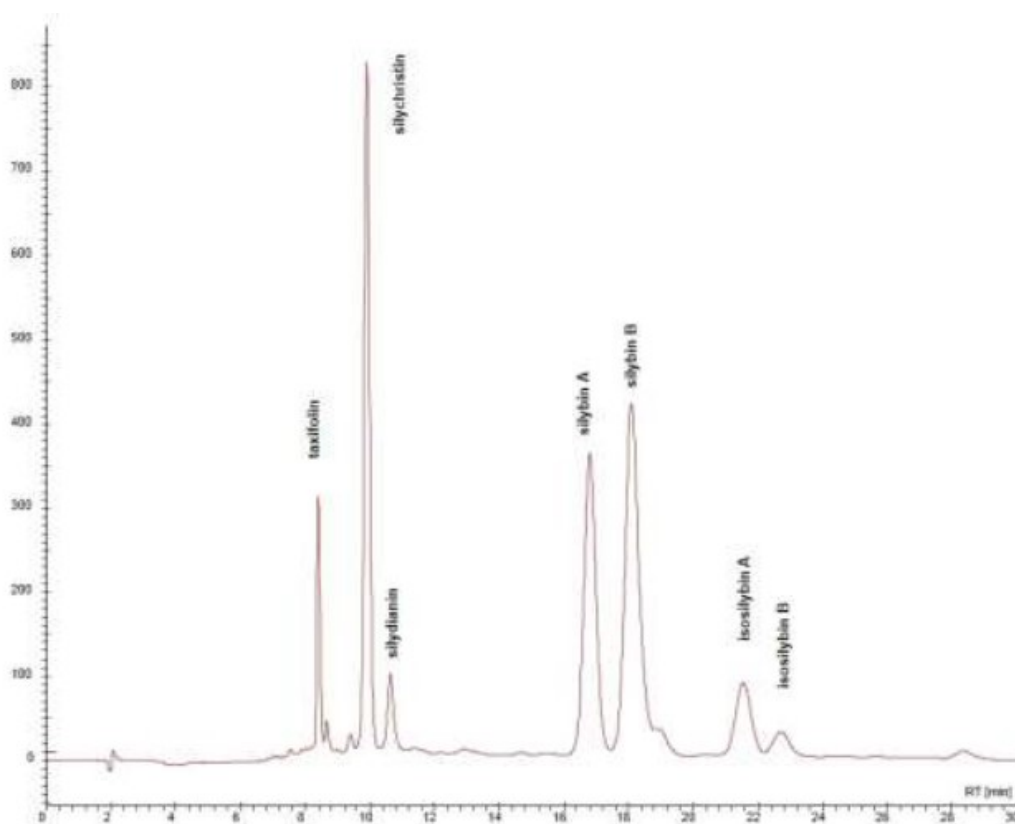
$$a = 0$$

$$b = 3,28158$$



#### 4.4.4 Chromatogram HPLC hlavních obsahových látek ostropestřece

Obr. 22: Chromatogram HPLC hlavních obsahových látek ostropestřece



Tabulka č. 1: Retenční časy sledovaných látek

Látka silymarinového komplexu	Retenční čas (min)
Taxifolin	9,05
Silychristin	10,93
Silydianin	11,76
Silybin A	16,98
Silybin B	18,20
Isosilybin A	21,39
Isosilybin B	22,48

#### 4.4.5 Statistické vyhodnocení [51,52]

Aby se mohl tento experiment vyhodnotit a zjistilo se, zda jsou získané poznatky relevantní, je potřeba data statisticky zpracovat.

První veličinou, která se zkoumala, byla směrodatná odchylka. Ta definuje míru odchylky, kterou se naměřené hodnoty liší od svého průměru (střední hodnoty). Matematicky ji lze vyjádřit takto:

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

$s$  – směrodatná odchylka

$y_i$  – hodnota členu sledované veličiny

$\bar{y}$  – aritmetický průměr hodnot sledované veličiny

$n$  – počet pozorování

Aby se potvrdila statistická významnost provedeného experimentu a mohlo se tak s určitostí říct, zda elicitor skutečně ovlivňoval obsah flavonolignanů a flavonoidu taxifolinu v explantátové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn, byl použit t-test rozdílu dvou průměrů. Ten porovná výsledky měření na skupině s přidavkem elicitoru s hodnotami, které vyplynou z měření vzorků kultur, na něž se vliv elicitoru neuplatňoval (= kontrola). Následně vyhodnotí, zda má zjištěný rozdíl hodnot skutečně vypovídající hodnotu a mohl by tak mít pro budoucnost reálný význam. Pro testovací kritérium platí následující vztah:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$t$  – testovací kritérium

$x_1$  – aritmetický průměr kontrolního souboru

$x_2$  – aritmetický průměr pokusného souboru

$S_1$  – směrodatná odchylka kontrolního souboru

$S_2$  – směrodatná odchylka pokusného souboru

$n_1$  – počet členů kontrolního souboru

$n_2$  – počet členů pokusného souboru

Před hodnocením testu je důležité určit si stupeň volnosti ( $\nu$ ) a vhodně zvolit hladinu významnosti ( $p$ ). Stupeň volnosti se vypočítá podle vzorce:

$$\nu = n_1 + n_2 - 2$$

Jelikož počet členů každého souboru je roven 3 (probíhala 3 současná proměření vzorků –  $n_1 = n_2 = 3$ ), stupeň volnosti je v tomto případě roven 4. Hladinu významnosti  $p$  byla stanovena na obvyklou mez **0,05**.

Z těchto 2 údajů byla poté získána tzv. kritická hodnota testovacího kritéria –  $t_p(\nu)$ . V tomto případě je rovna **2,78**.

Naměřené hodnoty se následně vyhodnotí t-testem. Vypočítané hodnoty testovacího kritéria ( $t$ ) se porovnají s kritickou hodnotou testovacího kritéria ( $t_p(\nu)$ ). Pokud pro vypočtené hodnoty platí  $t > 2,78$ , znamená to, že jsou výsledky experimentu statisticky významné.

Vliv působení elicitoru ve vzorcích odebraných v intervalech po 6, 24 a 48 h byl porovnán s kontrolou po 24 h, vzorky odebrané po 72 a 168 h elicitace byly porovnávány s kontrolou po 168 h.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Tabulky

#### 5.1.1 Obsah flavonolignanů ( $\mu\text{g/g DW}$ ) v kalusové kultuře *Silybum marianum* po působení elicitoru ve třech koncentracích

Tabulka č. 2: Vliv stresoru o koncentraci  $C_1$  ( $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l)

Doba odběru (h)	SILCR	S	T-test	SIL A	S	T-test	ISO A	S	T-test	ISO B	S	T-test
6	0	0	6343,21	0,542	0,002	698,21	1,731	0,002	4,54	0	0	815,77
24	2,203	0,003	2457,25	1,862	0,001	75,02	1,932	0,002	847,48	0,706	0,001	285,8
24 K	7,331	0,002	–	2,000	0,003	–	0,828	0,001	–	0,471	0,001	–
48	10,360	0,003	1454,71	4,139	0,003	870,28	0	0	3,00	0	0	815,77
72	0	0	1106,37	4,064	0,003	1494,21	2,013	0,002	1720,30	D	0	65535
168	20,641	0,004	7493,29	D	0	2249,82	0	0	65535	0	0	65535
168 K	1,281	0,002	–	1,329	0,001	–	0	0	–	0	0	–

Tabulka č. 3: Vliv stresoru o koncentraci  $C_2$  ( $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l)

Doba odběru (h)	SILCR	S	T-test	SIL A	S	T-test	ISO A	S	T-test	ISO B	S	T-test
6	0	0	65535	0,542	0,002	154,76	1,731	0,002	1499,01	0	0	1260,93
24	0,789	0,002	682,99	1,862	0,001	820,99	0,731	0,001	1227,84	1,372	0,002	497,46
24 K	0	0	–	0,795	0,002	–	0	0	–	0,728	0,001	–
48	6,174	0,001	10415,94	1,564	0,003	360,18	0	0	65535	1,957	0,002	950,78
72	9,399	0,003	2829,31	1,867	0,002	676,75	0	0	65535	0	0	65535
168	30,508	0,004	9708,41	0	0	657,43	0	0	65535	0	0	65535
168 K	2,446	0,003	–	0,760	0,002	–	0	0	–	0	0	–

Tabulka č. 4: Vliv stresoru o koncentraci  $C_3$  ( $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l)

Doba odběru (h)	SILCR	S	T-test	SIL A	S	T-test	ISO A	S	T-test	ISO B	S	T-test
6	6,096	0,003	1742,32	0,452	0,002	137,17	D	0	–	D	0	–
24	3,187	0,002	440,20	0,456	0,001	169,19	D	0	–	0	0	–
24 K	2,468	0,002	–	0,676	0,002	–	D	0	–	D	0	–
48	0,405	0,002	1261,85	0	0	585,41	D	0	–	0	0	–
72	1,920	0,002	1109,39	0,509	0,002	438,98	D	0	–	0	0	–
168	6,530	0,003	413,61	0	0	65535	D	0	–	0	0	–
168 K	5,335	0,004	–	0	0	–	D	0	–	0	0	–

5.1.2 Obsah flavonolignanů (µg/g DW) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* po působení elicitoru ve třech koncentracích

Tabulka č. 5: Vliv stresoru o koncentraci C<sub>1</sub> (3,845.10<sup>-3</sup> mol/l)

Doba odběru (h)	SILCR	S	T-test	SIL A	S	T-test	ISO A	S	T-test	ISO B	S	T-test
6	14,783	0,002	12802,45	0,65	0,001	1125,83	1,073	0,003	2096,66	14,781	0,004	6400,36
24	6,99	0,001	12107,04	0	0	65335	6,966	0,004	287,52	15,888	0,003	160,28
24 K	0	0	–	0	0	–	6,136	0,003	–	0	0	–
48	3,367	0,002	2915,91	0	0	65335	7,217	0,003	441,32	12,86	0,002	11137,09
72	3,785	0,003	1799,04	0	0	1037,5	2,438	0,002	184,94	13,219	0,002	11447,99
168	0	0	6521,17	0	0	1037,5	4,934	0,001	1699,47	16,746	0,003	9668,31
168 K	7,53	0,002	–	1,198	0,002	–	2,74	0,002	–	0	0	–

Tabulka č. 6: Vliv stresoru o koncentraci C<sub>2</sub> (3,845.10<sup>-4</sup> mol/l)

Doba odběru (h)	SILCR	S	T-test	SIL A	S	T-test	ISO A	S	T-test	ISO B	S	T-test
6	6,373	0,003	3679,45	0,61	0,001	1056,55	1,528	0,003	1881,21	4,781	0,002	4140,47
24	3,501	0,001	6063,91	0	0	65335	4,702	0,002	688,87	6,997	0,002	6059,58
24 K	0	0	–	0	0	–	6,136	0,003	–	0	0	–
48	6,692	0,002	5795,44	0	0	65335	0,969	0,001	2830,08	2,831	0,002	2453,45
72	0	0	4347,45	0	0	1037,5	1,572	0,002	561,09	1,961	0,001	3398,28
168	2,755	0,002	2293,84	0	0	1037,5	0	0	1581,94	1,525	0,003	882,19
168 K	7,53	0,003	–	1,198	0,002	–	2,74	0,003	–	0	0	–

Tabulka č. 7: Vliv stresoru o koncentraci C<sub>3</sub> (3,845.10<sup>-5</sup> mol/l)

Doba odběru (h)	SILCR	S	T-test	SIL A	S	T-test	ISO A	S	T-test	ISO B	S	T-test
6	0	0	65335	0	0	65335	61,606	0,003	26646,93	0	0	–
24	51,915	0,003	29973,14	0	0	65335	21,511	0,003	7385,91	0	0	–
24 K	0	0	–	0	0	–	6,136	0,002	–	0	0	–
48	32,29	0,002	27963,96	0	0	65335	14,968	0,002	5408,47	0	0	–
72	25,444	0,002	8605,61	0	0	1037,5	12,62	0,001	12100,48	0	0	–
168	0,933	0,002	3140,27	0	0	1037,5	0,38	0,002	1828,05	0	0	–
168 K	7,53	0,003	–	1,198	0,002	–	2,74	0,001	–	0	0	–



5.1.3 Obsah flavonolignanů (µg/ml) v médiu kalusové a suspenzní kultury  
*Silybum marianum* po působení elicitoru ve třech koncentracích

Tabulka č. 8: Přítomnost sledovaných látek v médiu kalusové kultury

Doba odběru (h)	Koncentrace C <sub>1</sub> (3,845.10 <sup>-3</sup> mol/l)			Koncentrace C <sub>2</sub> (3,845.10 <sup>-4</sup> mol/l)			Koncentrace C <sub>3</sub> (3,845.10 <sup>-5</sup> mol/l)												
	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO B	ISO B
6	0,037	D	0,041	0	0,028	D	0,037	0	0,084	D	D	0,084	0	0,030	D	D	0,030	0	0
24	0,033	D	0,041	0	0	D	0,032	0	0	D	D	0,030	0	0	D	D	0,030	0	0
24 K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0,026	D	0,041	0	D	D	0,047	0	0,021	D	D	0,021	0	0,034	D	D	0,034	0	0
72	0,030	D	0,023	0	D	D	0,044	0	0,034	D	D	0,034	0	0,033	D	D	0,033	0	0
168	D	D	0,046	0	D	D	0,043	0	0,033	D	D	0,033	0	0,033	D	D	0,033	0	0
168 K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka č. 9: Přítomnost sledovaných látek v médiu suspenzní kultury

Doba odběru (h)	Koncentrace C <sub>1</sub> (3,845.10 <sup>-3</sup> mol/l)			Koncentrace C <sub>2</sub> (3,845.10 <sup>-4</sup> mol/l)			Koncentrace C <sub>3</sub> (3,845.10 <sup>-5</sup> mol/l)											
	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO A	SILCR	SIL A	ISO B
6	D	0,037	0,041	0,063	0	0,023	0,023	0	0,050	0,049	0	0,050	0	0,035	0	0,044	0	0
24	0,037	0,024	0,041	0,171	0,032	0,049	0,042	0,068	0,044	0,044	0	0,044	0	0,044	0	0,044	0	0
24 K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	D	0,023	0,046	0,200	D	0,030	0,061	0,060	0,044	0,044	0	0,044	0	0,044	0	0,044	0	0
72	0,224	0,021	0,053	0,248	0,022	D	0,055	0,054	0,048	0,048	0	0,044	0	0,044	0	0,044	0	0
168	0,384	0,025	0,079	0,573	0,057	0	D	0,065	0,063	D	0	0,063	0	0,063	0	0,063	0	0
168 K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

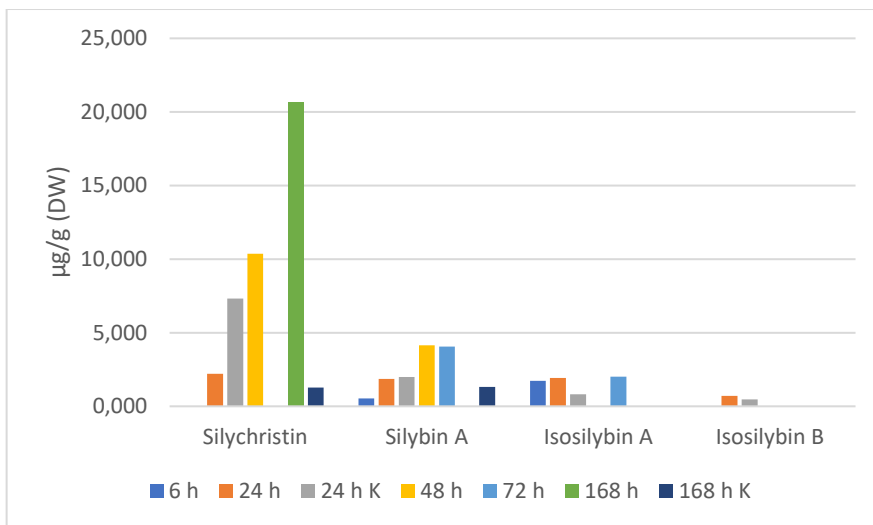
Pozn.: Přítomnost silydianinu, silybinu B ani taxifolinu nebyla zjištěna v žádném vzorku.

**Vysvětlivky:** SILCR – silychristin; SIL A – silybin A; ISO A – isosilybin A; ISO B – isosilybin B; S – směrodatná odchylka, T-test – hodnota testovacího kritéria; 24 K, 168 K – kontrolní vzorky odebrané po 24 a 168 h; 0 – přítomnost nebyla zjištěna; D – detekováno množství pod 0,001 µg/g DW, DW – dry weight (suchá hmotnost); **tučně** – statisticky významné výsledky

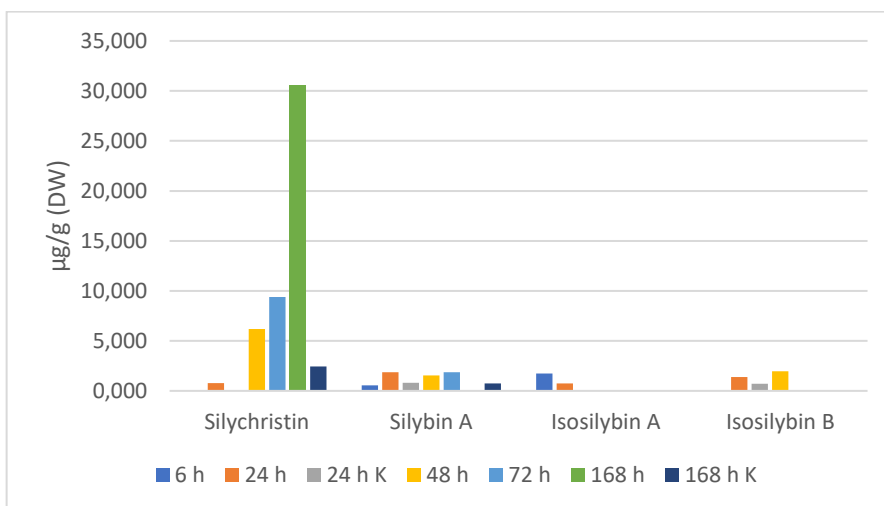
## 5.2 Grafy

### 5.2.1 Obsah flavonolignanů (µg/g DW) v kalusové kultuře *Silybum marianum* po působení elicitoru ve třech koncentracích

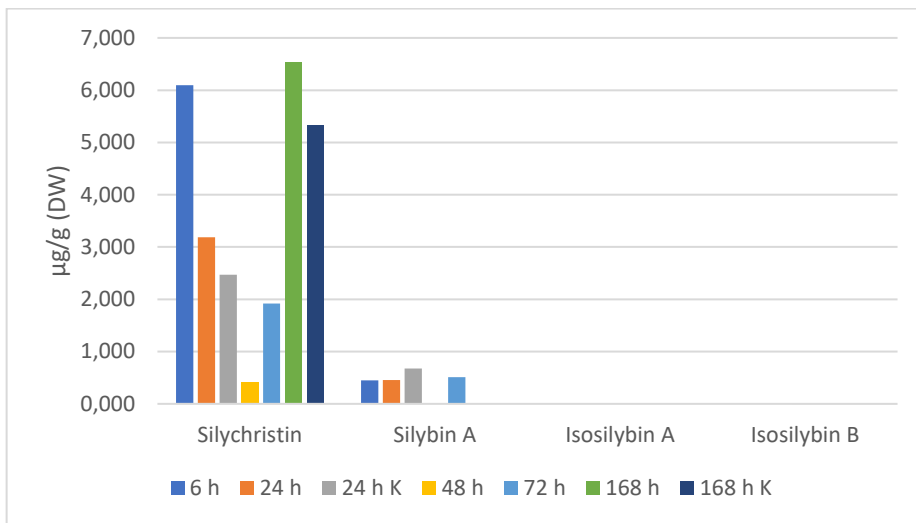
Graf č. 1: Působení elicitoru o koncentraci C<sub>1</sub>



Graf č. 2: Působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub>

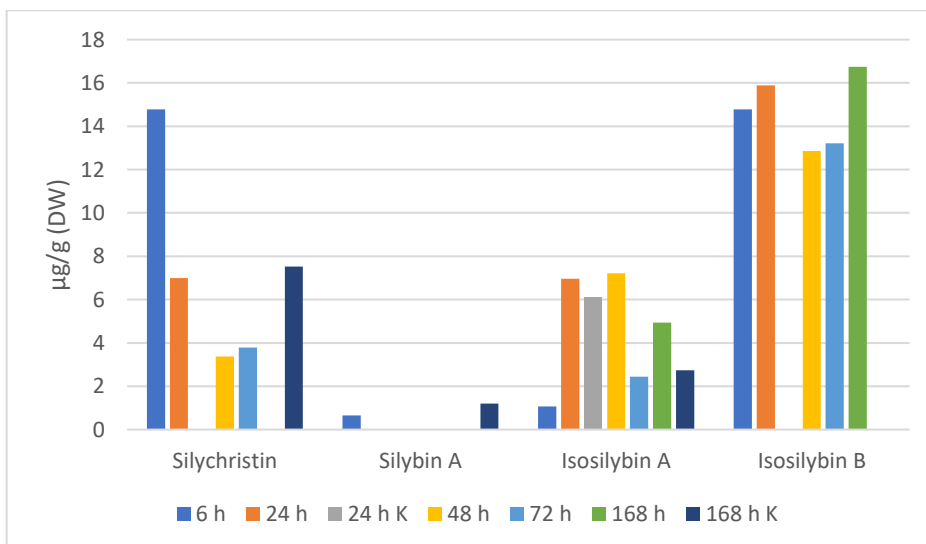


Graf č. 3: Působení elicitoru o koncentraci C<sub>3</sub>

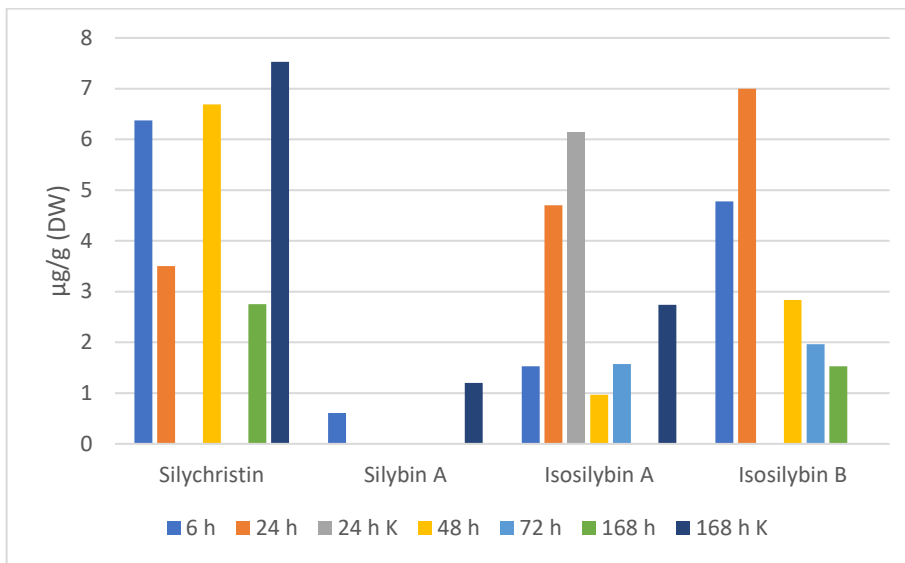


### 5.2.2 Obsah flavonolignanů (µg/g DW) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* po působení elicitoru ve třech koncentracích

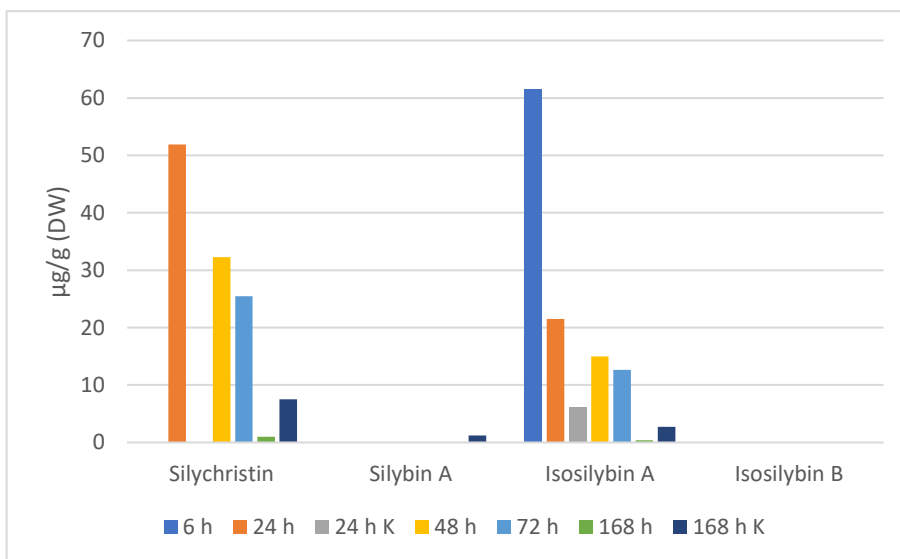
Graf č. 4: Působení elicitoru o koncentraci C<sub>1</sub>



Graf č. 5: Působení elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub>



Graf č. 6: Působení elicitoru o koncentraci C<sub>3</sub>



## 6 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo osvojit si základní poznatky o kultivaci explantátových kultur v kalusové i suspenzní kultuře. Dále kvantifikovat a popsat vliv abiotického elicitoru *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamidu na sekundární metabolismus *in vitro* rostlinných buněk *Silybum marianum*. Kultivace probíhala na MS médiu s přídatkem 10 mg/l kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové.

Proces elicitace a jeho úspěšnost závisí na několika faktorech, které jsou zcela specifické pro každý jednotlivý elicitor a explantátovou kulturu rostlinných buněk. Hlavní dvě charakteristiky elicitace jsou koncentrace použité látky a délka jejího působení v kultuře. Byly použity 3 rozdílné koncentrace pyridinového derivátu:  $C_1 = 3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l,  $C_2 = 3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l a  $C_3 = 3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Toto ředění bylo analogické jako v jiných pracích, které se zabývaly podobnou tematikou. Jednotlivé vzorky byly odebrány po 6, 24, 48, 72 a 168 h elicitace. Kontrolní vzorky po 24 h a 168 h byly dostačující, protože běžně se produkce sekundárních metabolitů bez působení elicitorů v takto krátkých časových intervalech výrazně nemění. [53]

### ***Kalusová kultura***

Působení elicitoru o koncentraci  $C_1$  nejvýznamněji ovlivnilo produkci silychristinu, zejména po 168 h působení, kdy se jeho obsah zvýšil na 20,641  $\mu\text{g/g}$  DW. Ke statisticky významnému navýšení obsahu silychristinu došlo i po 48 h. Silybin A byl pozitivně ovlivněn po 48 h (4,139  $\mu\text{g/g}$  DW) elicitace, o něco méně i po 72 hodinách; isosilybin A po 6, 24 a nejvýznamněji po 72 hodinách (2,013  $\mu\text{g/g}$  DW) elicitace. Hladina produkce isosilybinu B se zvýšila pouze po 24 hodinách působení elicitoru (0,706  $\mu\text{g/g}$  DW). (Viz tabulka č. 2, graf č. 1.)

Koncentrace elicitoru  $C_2$  opět nejvíce povzbudila syntézu silychristinu, a to po 168 h aplikace elicitoru, kdy produkce stoupla až na 30,508  $\mu\text{g/g}$  DW. K nárůstu produkce došlo i po 24, 48 a 72 hodinách. V těchto časových intervalech bylo zaznamenáno i zvýšení hladiny silybinu A (1,867  $\mu\text{g/g}$  DW), maximální však po 72 h. Syntéza isosilybinu A byla kladně ovlivněna více po 6 h (1,731  $\mu\text{g/g}$  DW), ale i

po 24 hodinách elicítace. Produkce isosilybinu B se zvýšila po 24 h, výrazněji však po 48 h (1,957 µg/g DW) působení elicitoru. (Viz tabulka č. 3, graf č. 2.)

Ve třetí sérii pokusů s elicítorem o koncentraci C<sub>3</sub> byl potvrzen jeho pozitivní vliv na zvýšení hladiny silychristinu. Největší nárůst jeho obsahu na 6,530 µg/g DW byl zaznamenán po 168 h působení, dále i po 6 a 24 h. Silybin A zareagoval pouze po 72 h elicítace mírným zvýšením svého obsahu na 0,509 µg/g DW. Isosilybin A a isosilybin B byly detekovány pouze ve stopovém množství, nebo nebyly detekovány vůbec. (Viz tabulka č.4, graf č. 3.)

Lze tedy konstatovat, že nejvíce byla kalusová kultura ovlivněna působením elicitoru o koncentraci C<sub>2</sub>, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení koncentrace 4 složek silymarinového komplexu, navíc bylo zvýšení produkce sledovaných sekundárních metabolitů zaznamenáno nejčastěji. Po 168 h působení této koncentrace elicitoru bylo také detekováno nejvyšší množství silychristinu (30,501 µg/g DW) a po 48 h isosilybinu B (1,957 µg/g DW). Elicitor o koncentraci C<sub>1</sub> kladně ovlivnil téměř polovinu vzorků, dosáhl maximální produkce silybinu A po 48 h působení (4,139 µg/g DW) a isosilybinu A po 72 h působení (2,013 µg/g DW) v kalusové kultuře. Nejmírnější pozitivní vliv na produkci flavonolignanů v kalusové kultuře měl elicitor o koncentraci C<sub>3</sub>.

Zároveň byla sledována i přítomnost jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v kultivačních médiích. Vždy mimo kontroly byla zjištěna přítomnost isosilybinu A. Zajímavé je, že jeho nejvyšší hladina 0,084 µg/ml byla zaznamenána po 6 hodinách působení elicitoru o koncentraci 3,845.10<sup>-5</sup> mol/l, kdy byla jeho přítomnost v buňkách kalusu ve všech zkoumaných případech detekována pod hranicí 0,001 µg/g DW. Silybin A byl detekován taktéž ve všech případech, ale pouze ve velmi malých množstvích pod hranicí 0,001 µg/ml. Přítomnost silychristinu v médiu byla zjištěna také, zvláště během působení elicitoru o koncentraci C<sub>1</sub>, nejvíce po 6 h (0,037 µg/ml). Při působení elicitoru v ostatních 2 koncentracích byl detekován jen ve stopových množstvích. V kontrolních vzorcích nebyla přítomnost sledovaných sekundárních metabolitů zjištěna. (Viz tabulka č. 8.)

## ***Suspenzní kultura***

Během působení elicitoru o koncentraci  $C_1$  bylo zaznamenáno maximální zvýšení hladiny silychristinu po 6 hodinách jeho působení (14,783  $\mu\text{g/g DW}$ ), dále i po 24 a 48 hodinách. Silybin A zvedl svou produkci pouze po 6 hodinách působení elicitoru (0,65  $\mu\text{g/g DW}$ ). Isosilybin A pozitivně reagoval na přítomnost elicitoru po 24 a 168 h jeho aplikace, nejvíce ale po 48 h, kdy jeho hladina obsahu dosáhla na 7,217  $\mu\text{g/g DW}$ . Nejvíce ovlivněna byla produkce isosilybinu B, a to během celé sledované doby působení elicitoru s maximem ve 168 hodině působení elicitoru (16,746  $\mu\text{g/g DW}$ ). (Viz tabulka č. 5, graf č. 4.)

Při pokusu s elicitem o koncentraci  $C_2$  byl zjištěn významný nárůst produkce silychristinu po 6 a 24 hodinách, nejvíce však po 48 hodinách (6,692  $\mu\text{g/g DW}$ ) působení. Silybin A opět navýšil svou hladinu pouze po 6 hodinách působení elicitoru se srovnatelným výsledkem jako v předchozím případě (0,61  $\mu\text{g/g DW}$ ). Množství isosilybinu A po aplikaci elicitoru  $C_2$  bylo zjištěno vždy menší než v kontrolních vzorcích. Oproti tomu i při použití elicitoru v této koncentraci došlo k pozitivnímu nárůstu hladiny isosilybinu B ve všech časových intervalech, maximální hladina byla zaznamenána po 24 h elicitace (6,997  $\mu\text{g/g DW}$ ). (Viz tabulka č. 6, graf č. 5.)

V poslední části experimentu se zkoušeným elicitem o koncentraci  $C_3$  došlo k ovlivnění produkce pouze silychristinu a isosilybinu A, ovšem jejich hladina dosáhla na nejvyšší naměřené hodnoty jejich obsahu. Syntéza silychristinu byla nejvíce navýšena po 24 h působení elicitoru, kdy bylo detekováno množství 51,915  $\mu\text{g/g DW}$ ; dále i po 48 a 72 hodinách. Isosilybin A maximální hladiny produkce dosáhl po 6 hodinách působení elicitoru a to až na 61,606  $\mu\text{g/g DW}$ . Pozitivní vliv této koncentrace elicitoru byl zaznamenán i po 24, 48 a 72 hodinách. (Viz tabulka č. 7, graf č. 6.)

Působení elicitoru na suspenzní kulturu lze shrnout tak, že nejvíce ovlivňoval produkci sledovaných sekundárních metabolitů v nejvyšší koncentraci, tedy  $C_1$ . Došlo k ovlivnění 4 složek silymarinového komplexu, nejvíce však isosilybinu B s maximem po 168 h působení (16,746  $\mu\text{g/g DW}$ ). Elicitor o koncentraci  $C_2$  množství zjištěných složek silymarinového komplexu ovlivňoval v menším počtu případů a míře. Při použití elicitoru o koncentraci  $C_3$  došlo k ovlivnění pouze 2 metabolitů, které ale dosáhly maximální hladiny své produkce. Jednalo se o silychristin (po 24 h – 51,915  $\mu\text{g/g DW}$ ) a isosilybin B (po 6 h – 61,606  $\mu\text{g/g DW}$ ).

Uvolňování jednotlivých složek silymarinového komplexu do média probíhalo v suspenzní kultuře ve větší míře než v kalusové. Mimo silychristin a isosilybin A byl detekován i silybin A a isosilybin B. U silychristinu, isosilybinu A a isosilybinu B byly nejvyšší hladiny jejich obsahu zaznamenány shodně po 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l (0,384 µg/ml; 0,079 µg/ml a 0,573 µg/ml). Isosilybin B byl do média uvolňován ve vyšších množstvích oproti ostatním detekovaným metabolitům i po 24, 48 a 72 hodinách aplikace elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Patrně více se do média uvolnil i silychristin po 72 h aplikace téhož elicitoru. Silybin A byl do média nejvíce uvolňován po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l (0,049 µg/ml). V kontrolních vzorcích nebyla přítomnost sledovaných sekundárních metabolitů zaznamenána. (Viz tabulka č. 9.)

Při porovnání získaných výsledků produkce zkoumaných sekundárních metabolitů po aplikaci elicitoru v kalusových a suspenzních kulturách *Silybum marianum* byla úspěšnější elicítace v suspenzních kulturách, kdy byla zaznamenána jejich vyšší množství.

Na téma zvýšení produkce flavonolignanů a taxifolinu v rostlinné *in vitro* kultuře ostropestřece mariánského se zaměřilo již mnoho prací. Byla zjištěna velká rozmanitost ve výsledcích vlivu elicítace v závislosti na typu elicitoru.

Při použití elicitoru *N*-(4-chlorbenzyl)-5-*terc*-butyl-pyrazin-2-karboxamidu pro zjištění míry ovlivnění produkce flavonolignanů a taxifolinu, byl v kalusové kultuře *Silybum marianum* zjištěn nejlepší výsledek při použití jeho koncentrace  $3,292 \times 10^{-4}$  mol/l po 24 h působení na obsah silychristinu (0,280 mg/g DW) i taxifolinu (1,716 mg/g DW). Maximální množství silydianinu (0,140 mg/g DW) a silybinu B (0,131 mg/g DW) bylo detekováno po 12 hodinách přítomnosti elicitoru o koncentraci  $3,292 \times 10^{-5}$  mol/l. V suspenzní kultuře způsobila koncentrace  $3,292 \times 10^{-4}$  mol/l tohoto elicitoru nejlepších zvýšení obsahu taxifolinu (5,910 mg/g DW) po 24 h působení. Koncentrace elicitoru  $3,292 \times 10^{-3}$  mol/l maximálně navýšila obsah silychristinu (0,194 mg/g DW) po 6 h a hladinu produkce silydianinu (0,234 mg/g DW) po 12 h účinku. [54]



Ve studii zabývající se elicitacním účinkem stříbrných iontů ( $\text{AgNO}_3$ ) v suspenzní kultuře *Silybum marianum*, byl prokázán kladný vliv jak na produkci flavonolignanů tak i taxifolinu. Nejvyšší hladiny produkce taxifolinu ( $14,95 \mu\text{g/g DW}$ ) byly zaznamenány po 24 h elicitace  $0,8 \text{ mM}$  roztokem  $\text{Ag}^+$ . Silydianin byl nejvíce produkován po 24 h působení elicitoru o koncentraci  $0,2 \text{ mM}$  ( $7,32 \mu\text{g/g DW}$ ). Nejvýznamnější nárůst obsahu silychristinu způsobil elicitor o koncentraci  $2 \text{ mM}$  po 216 h ( $30,6 \mu\text{g/g DW}$ ). Maximální produkce silybinu ( $9,5 \mu\text{g/g DW}$ ) a isosilybinu ( $4,4 \mu\text{g/g DW}$ ) nastala shodně po 216 h aplikace elicitoru o koncentraci  $1 \text{ mM}$ . [55]

V práci, kde se prověřovala míra elicitacního účinku pyridinového derivátu 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothiamidu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense*, bylo nejlepších výsledků elicitace dosaženo po 48 hodinách aplikace elicitoru v koncentraci  $1 \mu\text{mol/l}$ , kdy se hladina isoflavonoidů genistinu, dadzeinu a genisteinu zvýšila na  $11,6 \text{ mg/g DW}$ ,  $8,31 \text{ mg/g DW}$  a  $1,50 \text{ mg/g DW}$  (jednalo se o zvýšení o 152 %, 151 % a 400 % oproti kontrole). Formononetin zvýšil nejvíce svou hladinu o 97 % po použití  $10 \mu\text{mol/l}$  elicitoru a době působení 6 h na  $7,31 \text{ mg/g DW}$ . Tento elicitor měl příznivý vliv i na hladinu flavonoidů a to po 6 h působení, který zvyšoval produkci s rostoucí koncentrací použitého elicitoru od  $1 \mu\text{mol/l}$  do  $100 \mu\text{mol/l}$  (v tomto případě se produkce zvýšila o 142 % ve srovnání s kontrolou na množství  $5,78 \text{ mg/g DW}$ ). [38]

## 7 ZÁVĚR

Výsledky tohoto experimentu lze shrnout takto:

- V suspenzní i kalusové kultuře byly po elicitaci pyridinovým derivátem *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamidem detekovány tyto flavonolignany: silychristin, silybin A, isosilybin A a isosilybin B. Flavonoid taxifolin nebyl detekován v žádném ze vzorků.
- V kalusové kultuře nastala maximální produkce
  - silychristinu po 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l, kdy její hladina vystoupala na 30,508  $\mu\text{g/g DW}$ ;
  - silybinu A po 48 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l, kdy se vyšplhala na hodnotu 4,139  $\mu\text{g/g DW}$ ;
  - isosilybinu A po 72 hodinách působení elicitoru o stejné koncentraci na 2,013  $\mu\text{g/g DW}$ ;
  - isosilybinu B po 48 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l na 1,957  $\mu\text{g/g DW}$ .
- V suspenzní kultuře byla detekována nejvyšší hladina obsahu
  - silychristinu po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l, která byla 51,915  $\mu\text{g/g DW}$ ;
  - silybinu A po 6 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l a to 0,65  $\mu\text{g/g DW}$ ;
  - isosilybinu A taktéž po 6 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l, dosáhla na 61,606  $\mu\text{g/g DW}$ ;
  - isosilybinu B po 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l a to 16,746  $\mu\text{g/g DW}$ .

- Nejvyšší produkce silymarinového komplexu 30,508 µg/g DW v kalusové kultuře nastala po 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Jednalo se ale o pouze jedinou ze složek silymarinového komplexu – silychristin.
- Nejvyšší produkce silymarinového komplexu v suspenzní kultuře nastala po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l – 73,426 µg/g DW, kdy se tato hodnota skládala z 51,915 µg/g DW silychristinu a 21,511 µg/g DW isosilybinu A.
- V médiu kalusové a suspenzní kultury nebyla v kontrolních vzorcích zaznamenána přítomnost flavonolignanů ani taxifolinu.
- V médiu kalusové kultury byly detekovány silychristin, silybin A a nejčastěji isosilybin A, který byl zjištěn ve všech zkoumaných vzorcích mimo kontrolu. Nejvyšší hladiny dosáhl po 6 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l, kdy bylo detekováno 0,084 µg/ml.
- V médiu suspenzní kultury byly detekovány silychristin, silybin A, isosilybin A a isosilybin B. Silychristin, isosilybin A a isosilybin B svou hladinu nejvíce zvýšily shodně po 168 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l (0,384 µg/ml, 0,079 µg/ml a 0,573 µg/ml). Silybin A byl do média nejvíce uvolňován po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l (0,049 µg/ml).
- Více se složky silymarinového komplexu uvolňovaly do média suspenzních kultur.
- *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid se v tomto experimentu osvědčil jako potenciální elicitor pro zvýšení produkce jednotlivých složek silymarinového komplexu v kalusové i suspenzní kultuře *Silybum marianum*.
- *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid celkově zvýšil produkci zkoumaných sekundárních metabolitů ve větší míře v kultuře suspenzní.

## 8 SEZNAM LITERATURY

- 1) Schmidt B., Ribnicky D. M., Poulev A., Logendra S. et al.: A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism*. 2008; 57(1), S3–S9.
- 2) Molina A.: Plant biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 2010; 21(2), 182–184.
- 3) Jahodář L.: *Farmakobotanika – semenné rostliny*. 1. vyd. Praha: Karolinum 2006; 258 s.
- 4) Bijak M.: Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn) – Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017; 22(11), 1942.
- 5) Tůmová L., Řimáková J., Tůma J., Dušek J.: *Silybum marianum in vitro* – flavonolignan production. *Plant Soil Environ*. 2006; 52(10), 454–458.
- 6) Farkaš Ľ.: Pestrec mariánsky – história, súčasnosť a perspektiva. *Liečivé rastliny*. 2012; 49(2), 74 s.
- 7) Opletal L., Volák J.: *Rostliny pro zdraví*. 1. vyd. Praha: Aventinum 1999; 176 s
- 8) Neugebauerová J., Žďárská V.: *Léčivé rostliny pěstujeme – sbíráme – využíváme*. 1. vyd. Praha: Arista Books 2015; 260 s.
- 9) Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L. et al.: *Farmakognozie*. 1. vyd. Praha: Karolinum 2016; 348 s.
- 10) Kolektiv autorů: *Český lékopis 2017*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing 2017; 4870 s.
- 11) Spitzová I., Plaer M.: Vliv desikantů na biologickou hodnotu semen a kvalitu drog ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L. Gaertn). *Zahradnictví*. 1994; 24(2) 93–101.
- 12) Korejčková M.: *Ostropestřec mariánský – přírodní detoxikační prostředek*.  
<https://vehvezdach.cz/martina-korejckova-ostropestrec-mariansky-prirodni-detoxikacni-prostredek/> (23. 9. 2020)
- 13) Opletal L.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita: 3. svazek*. 1. vyd. Praha: Karolinum 2016; 700 s.

- 14) AbouZid S.: Silymarin, Natural Flavonolignans from Milk Thistle. In: Rao V.: Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. 1. vyd. Rijeka: IntechOpen 2012; 537 s.
- 15) Křen V., Walterová D.: Silybin and silymarin – new effects and applications. Biomed Pap. 2005; 149(1), 29–41.
- 16) Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: Věstník Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, řada: Národní odrůdový úřad. Brno 2020; 19(7), 30 s.
- 17) Šaradínová M.: V Olomouci vznikly nové odrůdy rostliny, jež prospívají játrům. Univerzita Palackého: Žurnál Online. 2017. <https://www.zurnal.upol.cz/> (2. 3. 2021)
- 18) Achufusi T. G. O., Patel R. K.: Milk Thistle. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541075/> (20. 10. 2020)
- 19) Vlastní zkušenost: Praktická cvičení předmětu technologie přírodních léčiv. Akademický rok 2019/2020.
- 20) Databáze léků SÚKL: SPC LP Flavobion©, Legalon©, Lagosa©, Silymarin AL© a Iberogast©. <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (20. 2. 2021)
- 21) Redakce Svět homeopatie: CARDUUS MARIANUS (Ostropestřec mariánský). <https://svethomeopatie.cz/cs/2908-carduus-marianus-ostropestrec-mariansky> (30. 1. 2021)
- 22) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. 3. vyd. Praha: Karolinum 200; 125 s.
- 23) Pavlová L.: Fyziologie rostlin. 1. vyd. Praha: Karolinum 2005; 254 s.
- 24) Kováč J.: Explantátové kultury rostlin. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci 1995; 142 s.
- 25) Ramachandra Rao S., Ravishankarb, G. A: Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv. 2002; 20(2), 101–153.
- 26) Kincl M., Krpeš V.: Základy fyziologie rostlin. 3. vyd. Ostrava: Tiskárna Baloušek 2006; 220 s.

- 27) Crosby D. G., Tang Ch. S.: Photodecomposition of 1-naphthaleneacetic acid. *J Agr Food Chem.* 1969; 17, 1291–1293.
- 28) Jahodář L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin. 2. vyd. Praha: Karolinum 2000; 55 s.
- 29) Namdeo A. G.: Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *PHCOG REV.* 2007; 1(1), 69–79.
- 30) World Health Organisation, IARC: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – Some Industrial Chemicals. 2000; 77; 508–528.
- 31) Gasperi V., Sibilano M., Savini I., Catani M. V.: Niacin in the Central Nervous System: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications. *Int. J, Mol. Sci.* 2019; 20(4), 974.
- 32) Hartl J., Palát K., Opletalová V., Doležal M. et al.: *Farmaceutická chemie II/1.* 1. vyd. Praha: Karolinum 1994; 106 s.
- 33) Hartl J., Doležal M., Krinková J., Miletín M. et al.: *Farmaceutická chemie III.* 2. vyd. Praha: Karolinum 2012; 117 s.
- 34) Dheda K., Gumbo T., Maartens G., E Dooley K. et al.: 2019 update: epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis and management of multidrug-resistant and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med.* 2019; 7(9), 820–826.
- 35) Unissa A. N., Subbian S., Hanna L. E., Selvakumar N.: Overview on mechanism of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol.* 2016; 45, 474–492.
- 36) Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V. et al.: *Farmaceutická chemie IV.* 2. vyd. Praha: Karolinum 2012; 166 s.
- 37) Qian Z-G., Zhao Z-J., Xu Y., Qian X. et al.: Novel synthetic 2,6-dichloroisonicotinate derivatives as effective elicitors for inducing the biosynthesis of plant secondary metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 71(2); 164–167.
- 38) Kašparová M., Siatka T., Klimešová V., Dušek J.: New Synthetic Pyridine Derivate as Potential Elicitor in Production of Isoflavonoids and Flavonoids in *Trifolium pratense* L. Suspension Culture. *Sci. World J.* 2012; 1–5.

- 39) Machová V.: Účinek derivátů 2-benzylthiopyridin-4-karbothiamidu na akumulaci isoflavonoidů a flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L.. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, 2012, 62 s.
- 40) 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.
- 41) Hanzlíková T.: Vliv derivátů pyrazinu na obsah sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách rostlin II. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, 2020, 68 s.
- 42) Chemical Entities of Biological Interest:  
<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28179> (26. 2. 2021)
- 43) PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (26. 2. 2021)
- 44) Grewal A. S., Kharb R., Prasad D. N., Singh Dua J. et al.: *N*-pyridin-2-yl benzamide analogues as allosteric activators of glucokinase: Design, synthesis, *in vitro*, *in silico* and *in vivo* evaluation. *Chem Biol Drug Des*. 2019; 93(3); 364–372.
- 45) Pchálková T.: *In vitro* screening potenciálních antimykobakteriálně účinných sloučenin na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* II. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, 2020, 104 s.
- 46) Doležal M.: Ústní sdělení, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK, 2019.
- 47) Nawrot D., Suchánková E., Jand'ourek O., Konečná K. et al.: *N*-pyridinylbenzamides: An Isosteric Approach Towards New Antimycobacterial Compounds. *Chemical Chem Biol Drug Des*. 2021; 97(3); 686–700.
- 48) Murashige T., Skoog F.: A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*. 1962; 15(3); 473–497.
- 49) Klimeš J. et al.: *Kontrola léčiv I*. 1. vyd. Praha: Karolinum 2006; 149 s.
- 50) Karlíček R. et al.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha: Karolinum 2005; 281 s.
- 51) Klemra P., Klemrová V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. 2. vyd. Praha: Karolinum 1997; 83 s.

- 52) Reisenauer R.: Metody matematické statistiky. 2. vyd. Praha: SNTL 1970; 240 s.
- 53) Kašparová M., Siatka T., Dušek J.: Biotická elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. Čes. slov. Farm. 2008; 57; 107–110.
- 54) Tůmová L., Tůma J., Doležal M., Dučaiová Z. et al.: New Synthetic Pyrazine Carboxamide Derivates as Potential Elicitors in Production of Secondary Metabolite in *In Vitro* Cultures. Phcog Mag. 2016; 12(45), 57–62.
- 55) Rahimi Ashtiani S., Hasanloo T., Bihamta M. R.: Enhanced production of silymarin by Ag<sup>+</sup> elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. Pharm Biol. 2010; 48(6), 708–715.



## 9 ABSTRAKT

### *Vliv abiotických elicitorů na obsah sekundárních metabolitů v in vitro kulturách rostlin – II.*

Metoda elicitace je využívána pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů v explantátových rostlinných kulturách. V práci byl testován vliv pyridinového derivátu *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamidu ve třech koncentracích  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l,  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l a  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l na produkci flavonolignanů v kalusových i suspenzních kulturách *Silybum marianum*. Hodnocení elicitačního vlivu probíhalo po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách proti kontrolním vzorkům bez přídavku elicitoru po 24 a 168 h. Ve stejných intervalech byly odebrány a hodnoceny vzorky kultivačního média. Buňky byly kultivovány na živné půdě dle Murashigeho a Skooga s přídavkem 10 mg/l kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové jako růstového regulátoru. Získané a následně upravené vzorky byly analyzovány metodou HPLC. Ze složek silymarinového komplexu byly detekovány silychristin, silybin A, isosilybin A a isosilybin B. Flavonoid taxifolin nebyl detekován v žádném případě. V kalusové kultuře se v součtu všech detekovaných složek silymarinového komplexu dosáhlo maximální produkce (30,508  $\mu\text{g/g DW}$ ) po 168 h působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l, jednalo se o jedinou látku – silychristin. Koncentrace elicitoru  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l a  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l působily na produkci jednotlivých složek silymarinového komplexu u kalusové kultury pozitivně v 50 % případů; koncentrace  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l zvyšovala jejich produkci v méně případech. V součtu obsahů detekovaných složek silymarinového komplexu bylo v suspenzní kultuře zjištěno jeho nejvýraznější zvýšení obsahu po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l, a to 73,426  $\mu\text{g/g DW}$  (51,915  $\mu\text{g/g DW}$  silychristin + 21,511  $\mu\text{g/g DW}$  isosilybin A). Opět i koncentrace elicitoru  $3,845 \cdot 10^{-3}$  mol/l a  $3,845 \cdot 10^{-4}$  mol/l způsobily statisticky významné zvýšení produkce silymarinového komplexu cca v polovině případů. Elicitor o koncentraci  $3,845 \cdot 10^{-5}$  mol/l pozitivně ovlivnil menší část vzorků. Bylo sledováno i uvolňování složek silymarinového komplexu do živného média. V médiu kultur bez přídavku elicitoru nebyla jejich přítomnost zaznamenána. V ostatních vzorcích bylo téměř v každém detekováno alespoň stopové množství některé látky silymarinového komplexu.

**Klíčová slova:** abiotická elicitace, explantátové kultury, *Silybum marianum*, silymarinový komplex, pyridinový derivát, *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid

## 10 ABSTRACT

### *The Effect of Abiotic Elicitors on the Content of Secondary Metabolites in In vitro Plant Cultures – II.*

The method of elicitation is used for the increased production of secondary metabolites in *in vitro* plant cultures. In this study, there the effect of pyridine derivate *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamide in three concentration -  $3.845 \cdot 10^{-3}$  mol/l;  $3.845 \cdot 10^{-4}$  mol/l and  $3.845 \cdot 10^{-5}$  mol/l for the production of flavonolignans in callus and suspension cultures of *Silybum marianum* was tested. The evaluation of elicitation effect proceeded after 6, 24, 48, 72 a 168 hours against control samples without the elicitor treatment after 24 and 168 hours. In the same intervals the samples of culture medium were taken and assessed. The cells were cultivated on Murashige and Skoog medium with 10 mg/ml of  $\alpha$ -naphthylacetic acid as growth regulator. The obtained and adjusted samples were analysed by the HPLC method. From the parts of silymarin complex were detected silychristin, silybin A, isosilybin A, isosilybin B. Flavonoid taxifolin wasn't detected in any case. In callus culture, there was achieved a maximal production of all detected components of silymarin complex ( $30.508 \mu\text{g/g DW}$ ) after 168 hours of elicitor treatment in concentration of  $3.845 \cdot 10^{-4}$  mol/l, it was about only substance – silychristin. The concentrations of elicitor  $3.845 \cdot 10^{-3}$  mol/l and  $3.845 \cdot 10^{-4}$  mol/l had a positive influence for the production of individual parts of silymarin complex in callus culture in 50 % of cases, the concentration  $3.845 \cdot 10^{-5}$  mol/l increased their production in less cases. After the contents results of detected parts of silymarin complex, there was found its most pronounced increasing after 24 hours of elicitor application in concentration of  $3.845 \cdot 10^{-5}$  mol/l, it was  $73.426 \mu\text{g/g DW}$  ( $51.915 \mu\text{g/g DW}$  silychristin +  $21.511 \mu\text{g/g DW}$  isosilybin A) in the suspension culture. The concentrations of elicitor  $3.845 \cdot 10^{-3}$  mol/l and  $3.845 \cdot 10^{-4}$  mol/l made again statistically significant increased production of silymarin complex substances in half cases. The elicitor in the concentration of  $3.845 \cdot 10^{-5}$  mol/l positive influenced a small part of samples. It was monitored a release of components of silymarin complex into nutrient medium. In the medium of cultures without elicitor treatment, there wasn't detected the present of this one. In other samples there were detected mostly in all cases at least trace amount of some components of silymarin complex.

**Key words:** abiotic elicitation, explant culture, *Silybum marianum*, silymarin complex, pyridine derivate, *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamide