UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra Farmaceutické botaniky a ekologie

Diplomová práce

Explantátové kultury vyšších rostlin 29

Jana Faltýnková

2008

Vedoucí: Doc. RNDr. Jiřina Dušková, CSc.

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Duškové, CSc. za odborné vedení a pomoc při vypracování diplomové práce. Děkuji také laborantce Ireně Rejlové za provedení HPLC analýzy a ostatním pracovníkům katedry za pomoc a ochotu při realizaci praktické části diplomové práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové 15.5.2008 .....

Podpis autora

Obsah

1 Úvod **1**

2 Řešená problematika **2**

3 Teoretická část **3**

3.1 Explantátové kultury 3

3.1.1 Rozdělení explantátových kultur 4

3.1.2 Suspenzní kultury 4

3.1.3 Složení kultivačních médií pro explantátové kultury 5

3.2 Možnost využití explantátových kultur k produkci sekundárních metabolitů . . 8

3.2.1 Sekundární metabolity 8

3.2.2 Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami 8

3.2.3 Možnost ovlivnění produkce sekundárních metabolitů 11

3.2.4 Biotransformace 13

3.3 Další využití explantátových kultur 15

3.4 Arbutin 15

4 Experimentální část **18**

4.1 Přístroje 18

4.2 Chemikálie 18

4.3 Použitý biologický materiál 19

4.4 Biotransformační pokusy 20

4.5 Analýza obsahových látek 21

5 Výsledky **23**

5.1 Výsledky TLC analýzy 23

5.2 Výsledky HPLC analýzy 25

5.3 Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l 27

5.4 Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l 32

6 Diskuze **37**

7 Závěr **40**

Kapitola 1

Úvod

Poslední desetiletí jsou charakterizována rychlým rozvojem výzkumu chemických léčiv a zaváděním velkého množství nových léků do praktického použití. Přesto pro nás stále zůstávají cenná biogenní léčiva, což jsou produkty látkové výměny organismů nebo jejich orgány, které se přímo nebo nepřímo používají k léčebným účelům jako léčiva, pomocné látky nebo obvazové prostředky [1].

Mezi jedny z nejdůležitějších přírodních látek patří ty, které vznikají díky sekundárnímu metabolismu (sekundární metabolismus představuje reakce vytvářející látky specifické pro určité taxony, zejména rostlinné, vyznačující se často určitým farmakologickým účinkem) [1].

Významnou drogou používanou v urologických čajovinách je Uvae–ursi folium. Obsahuje terapeuticky významný sekundární metabolit arbutin, který zde působí jako močové desinficiens. Byly prokázány jeho další účinky jako antimikrobiální, antitussický apod. Lze jej získat izolací z intaktní rostliny nebo několikastupňovou chemickou syntézou. Obě cesty jsou časově a ekonomicky náročné [2]. Celosvětově se zvyšující poptávka po arbutinu, jeho nízká toxicita a stále se rozšiřující spektrum využití v medicíně a kosmetice [3], [4], [5], [6], vede k progresivnějším metodám jeho získání [7].

Jednou z těchto metod je využití tkáňových (explantátových) kultur *in vitro*. Jedná se o různě velké, životaschopné části rostlinného organismu, pěstované po delší dobu za aseptických podmínek v uzavřených nádobách, obsahující vhodnou živnou půdu [8]. Bohužel tkáňová kultura *Arctostaphylos uva-ursi* arbutin, methylarbutin ani jejich aglykony neprodukuje [9]. Proto byly prováděny pokusy iniciovat tvorbu těchto látek v kultuře pomocí exogenních prekurzorů [2]. To se podařilo i u kultur dalších rostlinných druhů [2], [10], [11], [12], [13]. Příkladem této schopnosti je kultura *Datura meteloides*, která se také stala předmětem mého zkoumání.

Kapitola 2

Řešená problematika

Cílem mé diplomové práce je produkce arbutinu tkáňovou kulturou *Datura meteloides* za použití metody transformace exogenně přidaného hydrochinonu do živného média. Hydrochinon, který zde působí jako prekurzor žádaného metabolitu, byl přidáván v koncentracích 100 mg/l a 200 mg/l do kultivačního média na dobu 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 hodin. Pokusy byly prováděny v suspenzních tkáňových kulturách při denní světelné periodě .

Výtěžek byl zjištěn jednak kvalitativně za pomoci chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a také kvantitativně na základě kapalinové chromatografie (HPLC).

Kapitola 3

Teoretická část

3.1 Explantátové kultury

Vyšší rostliny jsou považovány za důležitý zdroj velkého množství biochemických látek, které slouží jako léčiva, pesticidy, ochucovací látky a vůně. Tradičně byly tyto substance získávány přirozenou cestou extrakcí z celých rostlin. Z komerčních důvodů bylo zapotřebí velké množství kultivovaných plodin (např. při získávání alkaloidů z *Catharanthus roseus*). Mnoho rostlinných produktů může být dnes produkováno též chemickou syntézou, což je metoda více spolehlivá, konsistentní a efektivní. Rostlinné explantátové kultury však poskytují alternativní přístup, který může být za určitých podmínek přínosný: např. pokud je pěstování rostlin složité, kultivační perioda je dlouhá nebo rostliny poskytují malý výtěžek. Jedná se též o případ kdy nebylo dosaženo chemické syntézy nebo pokud je to technicky problematické. Metabolický výtěžek u explantátových kultur může významně převýšit výtěžek u mateřských rostlin [14].

Díky rozsáhlé enzymové aktivitě rostlinných buněk dokáže explantátová kultura po přidání exogenních prekurzorů vyprodukovat jinak nedostupné látky. Při kultivaci *in vitro* dochází také k různým selekčním tlakům, což může vést ke změnám v metabolismu rostlinných buněk a k získání zcela nových produktů. V první řadě však slouží k produkci specifických rostlinných látek (např. enzymů, lektinů), které lze získat jen z živých buněk [15].

Pro úspěšné odvození explantátové kultury je potřeba získat sterilní část rostliny. V praxi se používá dvou postupů - vypěstování rostliny ve zcela sterilních podmínkách, nebo šetrná sterilizace části rostliny vypěstované za běžných podmínek. Oba tyto přístupy mají své výhody i nevýhody a jsou používány podle konkrétní situace (dostupnost materiálu) [16].

Po přenesení získané sterilní části rostliny (explantátu) na živnou půdu zpevněnou agarem se na řezu začne tvořit hojivé pletivo, které za optimálních podmínek stále narůstá . Tvoří se tzv. primární kalus, který se po oddělení přenese na novou živnou půdu a dále se kultivuje (kalus) [16].

Aseptické podmínky chrání explantát před patogenními či prostě konkurenčními mikroorganismy, které by jinak intenzivně využívaly tuto živnou půdu a rostlinnou tkáň by vy-

hladověly nebo přímo zahubily svými toxiny [8].

3.1.1 Rozdělení explantátových kultur

Kultury rostlinných explantátů lze podle anatomické charakteristiky zařadit do některé z následujících pěti kategorií:

Kultura orgánová - orgánové systémy, orgány resp. jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci [17].

Kultura tkáňová resp. kultura pletivová - do různého stupně soudržné, morfologicky desorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně (pletiva), pomnožované buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě [17].

Kultura suspenzní - volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované suspendovány v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované [17].

Kultura buněčná resp. kultura volných buněk - volné jednotlivé a identifikovatelné buňky, respektive jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném půdou [17].

Kultura protoplastová - jedná se o rostlinné buňky zbavené buněčné stěny. Jejich povrch tvoří pouze cytoplazmatická membrána [18].

Rostlinná tkáňová kultura, stejně jako kultury suspenzní či buněčné, je heterogenní směs buněk navzájem odlišných svou morfologií i fysiologickou funkcí [17].

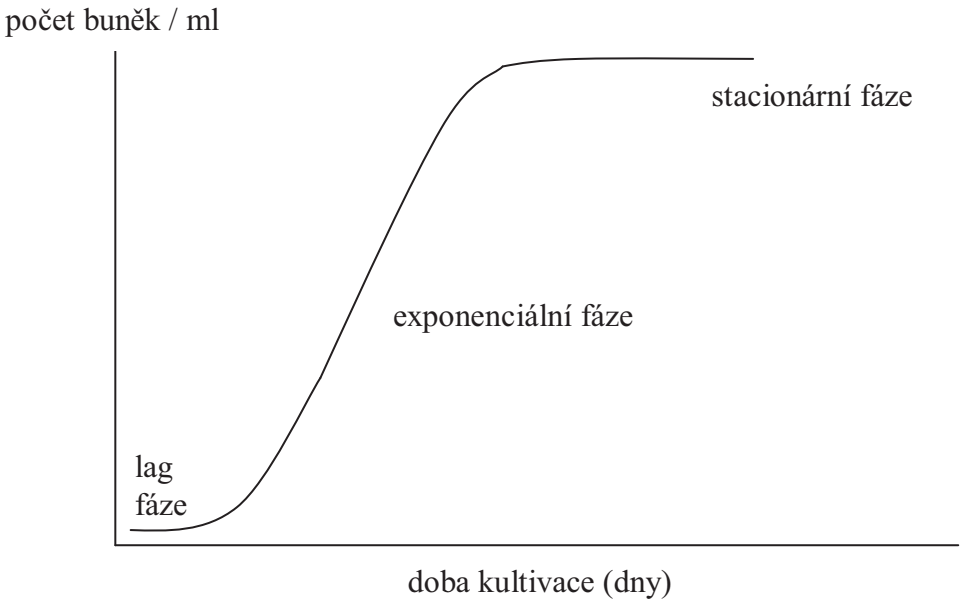
Manipulace s rostlinnými explantáty jsou umožněny zejména vzhledem k vysoké regenerační schopnosti mnohých rostlinných druhů. Toto lze pozorovat např. u hojení ran či klasického vegetativního rozmnožování. Také asepticky pěstovaná část rostlinného organismu, a to dokonce jediná tělní (somatická) buňka, může za určitých podmínek dát vznik celému novému jedinci, geneticky shodnému s výchozí rostlinou, dárcem [8].

3.1.2 Suspenzní kultury

Pokud potřebujeme z kalusové kultury dále odvodit kulturu suspenzní, přeneseme část kalusu do tekutého média. Za stálého míchání vzniká suspenzní kultura, skládající se v ideálním případě z jednotlivých buněk [16]. Použití tekutých médií umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné. Snadný přístup živin a dobrá výměna dýchacích plynů v pohybujícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst suspenzní kultury [18]. Za předpokladu měnících se podmínek kultivace (složení média, hustota buněčné suspenze atd.), lze tento jev charakterizovat tzv.

růstovou křivkou. Křivka nám graficky znázorňuje závislost některé z růstových charakteristik suspenze (čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina atd.) na čase [18].

Průběh křivky (viz obr. 3.1) je charakteristický pomalým růstem suspenzní kultury těsně po naočkování (lag fáze), velmi intenzivním nárůstem v exponenciální fázi a poklesem popř. úplným zastavením růstu ve stacionární fázi. Růst buněk ve stacionární fázi je především limitován nedostatkem živin, které byly vyčerpány z média v průběhu exponenciálního růstu [18].



Obrázek 3.1: Růstová křivka suspensní kultury

Po určité době je nutné kulturu pasážovat (subkultivovat), protože postupně dochází k vyčerpání média. Při pasážování se část buněk přenese za sterilních podmínek na čerstvou živnou půdu [16]. Pasážování je nezbytné provádět na konci exponenciální fáze růstu, která je charakteristická aktivním dělením a růstem buněk. V exponenciální fázi není růst buněk limitován exogenními faktory [18].

Díky rychlému růstu patří suspenzní kultury k často využívaným prostředkům pro zkoumání a získávání farmakologicky účinných látek.

3.1.3 Složení kultivačních médií pro explantátové kultury

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je složení kultivačního média.

Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky [18]:

Makroelementy - Dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra. Optimální koncentrace kaž-

dého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu [18].

Mikroelementy - Železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden [18].

Zdroj uhlíku - Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie se používá sacharóza. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů, protože jejich schopnost autotrofní výživy je velmi omezena [18].

Vitamíny - Normální rostlina si sama syntetizuje vitamíny nezbytné k jejímu růstu a vývoji a také ke katalyzování řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Dále se používají biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin atd. Jejich přítomnost v médiích však není většinou nezbytná [18].

Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku - Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých aminokyselin v živném médiu stimulovat růst explantátů. Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát). Velmi často se používá také L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin [18].

Nedefinované organické složky médií - Růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Do médií se také někdy dodává aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů [18].

Látky používané pro zpevnění média - Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar, který má oproti jiným gelizujícím látkám řadu výhod. Je-li např. agar smíchán s vodou, dojde k vytvoření gelu při teplotě 60-100 °C, který tuhne přibližně při 45 °C. Agarové gely jsou tedy stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Vedle agaru je možné používat ke zpevnění média také agarózu, Phytagel a Gerlite, které představují syntetické látky. V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty "fixovat" na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě (rockwool), perforovaném celofánu nebo se používají tzv. "rafty" (Liferaft). Jedná se o plastové nosiče, do kterých se upevňuje polypropylenová membrána. Explantát se potom pokládá na membránu, která plave na povrchu tekutého kultivačního média [18].

Růstové regulátory - Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin : auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. O charakteru růstu explantátové kultury nerozhoduje pouze koncentrace jednotlivých hormonů,

ale také jejich vzájemný poměr. Mezi auxiny používané v explantátových kulturách rostlin patří především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmáselná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4 D) a kyselina naftyloctová (NAA). Auxiny stimulují růst kalusu a buněk. Mezi cytokininy patří benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (2iP), furfurylaminopurin (kinetin) a zeatin. Cytokininy stimulují buněčné dělení. Většina explantátů nevyžaduje přítomnost giberelinů a kyseliny abscisové v médiu, ale u některých druhů mohou stimulovat jejich růst [18].

Ve všech případech je třeba při zhotovení živného média věnovat pozornost koncentraci vodíkových iontů. Obyčejně se doporučuje pH 5,5 až 6,0 [18].

V různých fázích rozmnožovacího cyklu má rostlina jiné požadavky, proto musí být chemické složení a fyzikální vlastnosti média odpovídající [18].

3.2 Možnost využití explantátových kultur k produkci sekundárních metabolitů

3.2.1 Sekundární metabolity

V rostlinách probíhá soubor životně důležitých reakcí, který se označuje jako primární metabolismus. Rostliny si pomocí tohoto procesu dokáží syntetizovat z přijmutých živin nepostradatelné složky pro své tělo (aminokyseliny, vitamíny, enzymy, nukleové baze, membránové lipidy apod.), tzv. primární metabolity. Určité rostlinné taxony se vyznačují sekundárním metabolismem, kdy dochází k dalším metabolickým reakcím vedoucím k přetváření primárních metabolitů na sekundární metabolity [18].

Pro sekundární metabolity je charakteristická téměř nepřeberná rozmanitost jejich chemických struktur, přesto se však dají uspořádat podle chemické příbuznosti asi do padesáti skupin [18]. Z nich je možno uvést např. flavonoidy, glykosidy, kumariny, fenoly, terpenoidy, naftaleny, lignany atd. [1].

Během životního cyklu hraje sekundární metabolismus významnou roli v interakcích rostliny s jejím okolím (např. hmyz, mikroorganismy, jiné rostliny apod.) [19] [20] [21]. Mnoho z nich je v rostlinách součástí obranné odpovědi na mikrobiální infekci a na útok býložravců [22]. Sekundární metabolity také hrají roli v reprodukci při lákání opylovačů, jsou důležitým aspektem kvality potravin (chuť, barva, vůně, ...) nebo jsou v podobě rostlinných pigmentů zodpovědné za diverzitu květů. Mimo to se mnoho rostlinných sekundárních metabolitů používá při barvení, ochucování nebo jako vůně či insekticidy. Hlavním oblastí zájmu je však medicína, kde se využívá terapeutických účinků jednotlivých metabolitů. Proto jsou tyto látky tak zajímavým cílem v pěstování rostlin [19].

Místa vzniku a ukládání sekundárních látek nejsou totožná. Tvoří se v určitých pletivech a orgánech, v protoplastech buňky, přemísťují se do jiných buněčných kompartmentů, do vakuol nebo do stěn. Další transport do jiných pletiv a orgánů se děje vodivými pletivy. Při transportu a na místě akumulace se mohou látky chemicky přeměňovat vlivem odlišných enzymových systémů působících v místech transportu a ukládání. Např. hyoscyamin vytvářený v kořenech rostlin čeledi *Solanaceae* se v nadzemních orgánech epoxiduje na skopolamin [1] [23].

3.2.2 Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami

Produkce sekundárních metabolitů mikroorganismy je už dlouho ekonomicky využívána (antibiotika). Intaktní rostliny produkují ve srovnání s mikroorganismy mnohem širší spektrum sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mají význam ve farmacii, potravinářství aj. [24].

Poznatek o totipotenci rostlinných buněk (tj. že obsahují kompletní genetickou informaci výchozí rostliny) vedl k teorii o schopnosti tkáňové kultury produkovat stejné spektrum sekundárních metabolitů jako výchozí rostlina [16].

Z kalusových a suspenzních kultur byly izolovány různé rostlinné produkty včetně farmaceuticky významných látek (tab. 3.1) [15] [22]. Příkladem je diterpenový alkaloid taxol, který je obsažen v kůře *Taxus brevifolia*. Jedná se o důležitou látku užívanou v léčbě rakoviny prsu a vaječníků. Protože je v intaktní rostlině obsažen ve velmi malém množství a jeho spotřeba v medicíně se zvyšuje , hledaly se jiné způsoby jak jej získat. Výsledkem se stala velmi přínosná produkce taxolu explantátovými kulturami [12]. Stejným způsobem se získává tetracyklický triterpenoid kukurbitacin E z tkáňových kultur *Ecballium elaterium* [25].

Také lze vyprodukovat úplně nové látky jako v případě suspenzní kultury *Rauwolfia serpentina Benth.*, do které byl při kultivaci přidáván ajmalin a následně tato kultura začala tvořit indolový alkaloid 19-(S)-hydroxy-N-methylraumaclin [26].

Je-li výskyt žádané látky vázán na struktury či fyziologický stav vyskytující se jen v určitém rostlinném orgánu, syntéza často probíhá jen v kultuře odvozené z tohoto orgánu. To bylo zjištěno např. u *Atropa bella-donna* a *Rauwolfia serpentina* , kde tropany resp. reserpin, produkuje pouze kalus odvozený z kořene [24].

Jiným příkladem je antimalarická látka artemisinin, kterou lze získat z nediferencované kultury. Bylo však zjištěno, že kalus, odvozený ze stonku, poskytuje mnohem vyšší produkci [27].

I když totipotence rostlinných buněk byla nezvratně prokázána, neznamená to, že v nediferencovaném stavu je buňka vždy schopna tvorby všech enzymů, nezbytných pro dráhy sekundárního metabolismu. Anatomická diferenciace je často nezbytnou podmínkou produkce sekundárních metabolitů. Důvodem může být výhodné prostorové uspořádání enzymů, kompartmentace enzymu a substrátu, existence prostoru pro ukládání produktu nebo přítomnost specifických organel. Prokázala se důležitost kompartmentace pro separaci degradačních enzymů od akumulovaného metabolitu (v *Allium* alliinasy od alliinů) [24].

Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami je někdy menší než se očekává. Proto si analýza faktorů ovlivňujících tuto syntézu zasluhuje velkou pozornost (blíže o této problematice v kapitole 3.2.3).

Nelze však opomenout ekonomické faktory produkce, tj. získat rychle rostoucí kultury s vysokými koncentracemi cenných látek. Kalusové kultury mají význam spíše teoretický než praktický, protože pomalu rostou. Jsou však dobrými zdroji pro selekci vysoce produktivních suspenzních kultur a kromě toho mnoho farmaceuticky významných látek bylo zjištěno jen v kalusových kulturách [15].

Látka	Účinek	Producent
Ajmalicin	vasodilatans	*Catharanthus roseus*
Antrachinony	meziprodukty pro syntézu kancerostatik	*Morinda citrifolia*, *Cassia tora*
Berberin		*Thalictrum minus*, *Coptis japonica*
Diosgenin	steroidní hormony	*Dioscorea deltoidea*
Ginsenosidy	adjuvans, tonikum	*Panax ginseng*
Chinin	antimalarikum	*Cinchona ledgeriana*
Kodein	analgetikum	*Papaver somniferum*
Kofein	stimulans, kardiotonikum	*Camelia sinensis*, *Coffea arabica*
Morfin	analgetikum	*Papaver somniferum*
Reserpin	antihypertenzivum	*Rauwolfia sp.*
Saponiny		*Panax ginseng*
Šikonin		*Lithospermum erythrorhizon*
Taxol		*Taxus brevifolia*
Thebain	syntéza morfiových alkaloidů	*Papaver bracteatum*
Ubichinon-10	kardiotonikum	*Nicotiana tabacum*
Vinkristin	antileukemikum	*Catharanthus roseus*
Visnagin	kardiotonikum	*Ammi visnaga*

Tabulka 3.1: Rostlinné sekundární metabolity a jejich možné průmyslové využití

3.2.3 Možnost ovlivnění produkce sekundárních metabolitů

Využití tkáňových kultur je velmi efektivním řešením. Na produkci sekundárních metabolitů nemá vliv počasí, roční doba ani nežádoucí biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz apod.). Je možné kultivovat rostliny bez ohledu na jejich původ [16].

Problémem je ovšem skutečnost, že intaktní rostlina je diferencována jak v čase, tak i v prostoru. To znamená, že sekundární metabolismus zahrnující biosyntézu, transport, vzájemnou přeměnu, odbourávání, akumulaci a případně exkreci značného počtu sekundárních metabolitů, probíhá pouze během určitých omezených vývojových stádií organismu. Navíc v intaktní rostlině tyto procesy podléhají složité regulaci. Jen zřídka jsou sekundární metabolity tvořeny ve všech orgánech a během celého životního cyklu rostliny. Převedení rostliny do tkáňové kultury je pro buňky stresujícím faktorem, proto se často stává, že tkáňová kultura žádanou látku neprodukuje vůbec nebo jen ve velmi nízké koncentraci, případně produkuje něco jiného [16].

Poslední případ je poměrně častý a je důsledkem poruch v regulačním mechanismu, které vedou ke změně nebo blokádě metabolických drah. Pro překonání těchto potíží a získání vysoce produkčních kultur bylo vypracováno několik obecných postupů [16] :

Selekce vysoce produkčních kultur - Cílem je vybrat rostlinu, produkující co největší množství žádaných látek nebo pro případ biotransformace, rostlinu s co největší rychlostí přeměny žádaných metabolitů (např. produkce berberinu tkáňovou kulturou *Coptis japonica* [28]). I když tento krok není sám o sobě zárukou úspěchu, vytváří pro něj alespoň dobré předpoklady [16].

Optimalizace kultivačních podmínek - Jde o celou řadu faktorů, jejichž změna může (ale nemusí) ovlivnit biosyntetické možnosti tkáňových kultur žádaným směrem. Příkladem může být optimalizace složek živného média (např. zlepšení produktivity *Tabernaemontana divaricata* [28]), pH, aerace, světla, teploty, růstových regulátorů atd. Tato optimalizace se samozřejmě provádí pro každou kulturu zvlášť [16].

Vliv prekurzorů - Přidání vhodného prekurzoru umožnilo zvýšit v celé řadě případů produkci žádané látky [16].

Selekce buněčných linií - Po optimalizaci podmínek pro kultivaci se získané tkáňové kultury dělí na jednotlivé buňky (či spíše malé buněčné agregáty) , které se dále kultivují. Z takto vzniklých kultur se vybere nejprodukčnější, ta se opět vysévá a celý postup se opakuje až do dosažení žádaného výsledku [16].

Metabolické inženýrství - metabolické inženýrství může být využito mnoha způsoby ke zlepšení výtěžku a podle různých způsobu rozlišujeme metody :

1. Mutace - Používá se celé řady chemických činidel a UV záření. Např. tok uhlíku směrem k žádanému produktu může být zvýšen. Toho lze dosáhnout pomocí kroků, které ovlivní rychlost reakce, nebo blokováním kompetitivních drah. Jinou

možností je blokování katabolismu, což může být důležitý faktor. Např. v buněčných kulturách *Catharanthus roseus* bylo zjištěno, že rychlost biosyntézy ajmalicinu je podobná rychlosti katabolismu. Katabolismus nebo kompetitivní dráhy mohou být blokovány antisense geny. Pro zvýšení aktivity enzymu jsou nutné sense geny. Tyto geny mohou být přímo z dané rostliny, z jiné rostliny nebo z jiného organismu, např. mikrobiální geny [28]. Bohužel zásah do metabolismu je velmi komplexní, a možnost uspokojivé predikce výsledku tudíž malá. Největšího úspěchu bylo tímto způsobem dosaženo při získání vysoce produkčního kmene tkáňové kultury *Panax ginseng* [16] [29].

2. Rostlinné geny v jiných rostlinách - byla zkoumána biosyntéza terpenoidních indolových alkaloidů a klonována řada genů, s kterými byly prováděny různé experimenty ohledně jejich exprese. Zejména geny kódující tryptofan dekarboxylázu (TDC) strictosidin syntházu (STR) se projevily v různých rostlinách a rostlinných buňkách. Např. výsledkem exprese *tdc*-genu v rostlinách tabáku vede k produkci tryptaminu (Goddijn et al. 1994). Tento nový produkt byl získán ve výtěžku až 1% suché váhy. Přitom nebyl zaznamenán vzrůst aktivity enzymu anthranilát syntházy, což je první enzym vedoucí k produkci tryptofanu jakožto substrátu pro TDC [28].

3. Rostlinné geny v mikroorganismech - rostlinné sekundární metabolity jsou výsledkem dlouhých drah zahrnujících velké množství enzymů a velké množství genů. Proto je exprese kompletní cesty rostlinných sekundárních metabolitů v mikroorganismech nepravděpodobná. Pouze u krátkých drah je to možné, ale za předpokladu, že mikroorganismy poskytnou nezbytné prekurzory nebo pokud jsou tyto prekurzory přidávány do jejich živného média. Byl vydán patent na produkci terpenoidních indolových alkaloidů transgenními kvasinkami u nichž došlo k expresi genů kódujících strictodin syntházu a strictosidin glukosidázu. Na základě přidávání tryptaminu a sekologaninu do živného média začaly kvasinky produkovat strictosidin a ten uvolňovat do média. Bylo pozorováno pouze velmi malé množství kathenaminu, které je tvořeno ze strictosidinu pomocí glukosidázy. Bohužel secologanin není komerčně dostupný a touto cestou by to bylo finančně náročné. Zjistilo se však, že kvasinky velmi dobře rostou na médiu s obsahem šťávy z bobulí *Symphoricarpus albus*, která není jen výborným zdrojem karbohydrátů pro kvasinky, ale obsahuje kolem 1-2% sekologaninu. U transgenních kvasinek rostoucích na tomto médiu bylo pozorováno, že vyprodukovaly až kolem 2g/l média strictosidinu, bez jakýchkoli pokusů vylepšit produktivitu [28].

4. Mikrobiální geny v rostlinách - kyselina salicylová patří v rostlinách k důležitým signálním molekulám, která je součástí obranného systému. Kyselina salicylová je v rostlinách odvozena z fenylalaninu cestou kyseliny skořicové a benzoové . V mikroorganismech je však tvořena z chorismátu cestou přes isochorismát (katalyzování enzymem isochorismát syntházou) a následně je isochorismát přeměněn v kyselinu salicylovou pomocí enzymu isochorismát pyruvát lyasy. Geny kódující tyto enzymy byly přeneseny do tabáku a takto vzniklá transgenní rostlina začala produkovat kyselinu salicylovou v takovém množství, ze to zvýšilo resistenci proti primární infekci virem tabákové mozaiky [28].

Diferenciace - V celé řadě případů se potlačení morfologické diferenciace v tkáňových kulturách zobrazí snížením produkce sekundárních metabolitů. Pokud je tkáňové kultuře dovoleno dosáhnout jistého stupně diferenciace (například tvorba výhonků nebo kořenů u kalusu) , může dojít ke zvýšení produkce [16]. Příkladem úspěchu je získání vysoké produkce tropanových alkaloidů z *Atropa bella-donna*, které nejsou produkovány v suspenzních kulturách, ale vyskytují se ve velkém množství v kulturách odvozených z kořenových vlásků [28].

Elicitace - biologické elicitory jsou sloučeniny biologického původu schopné vyvolat obrannou odpověď proti infekci [28]. V laboratorních podmínkách se jako elicitorů používá kompletních homogenátů inaktivovaných kultur mikroorganismů - bakterií a hub. Elicitory působí jako jakýsi stresový faktor vyvolávající obrannou reakci buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů [18]. Jako příklad obranné reakce je produkce fytoalexinů. Fytoalexiny jsou nízkomolekulární sloučeniny s antimikrobiální aktivitou, které jsou tvořeny a akumulovány v rostlinných buňkách po mikrobiální infekci [28]. Tyto látky mají bakteriostatické, fungistatické a cytostatické účinky. Produkce sekundárních metabolitů může být vedle biotických elicitorů stimulována také elicitory abiotickými (např. UV-záření, chlad, vysoká teplota, soli těžkých kovů, změny pH, změny osmotického potenciálu apod. [18].

Dvoufázový systém - v rostlinných buňkách je místo syntézy a místo uskladňování sekundárních metabolitů separované v kompartmentech. Např. akumulace monoterpenů v kultuře *Mentha* je většinou spojena s přítomností vysoce specializovaných struktur zahrnující sekreční a akumulační elementy, např. olejové žlázky, žlaznaté trichomy nebo žlaznatý epidermis. V nediferencovaném kalusu nebo suspenzní kultuře tato místa akumulace chybějí. Přidání uměle vytvořených míst pro akumulaci sekundárních metabolitů se ukázalo být velmi efektivním nástrojem pro zvýšení biosyntetické produkce. Pokud vytvořený produkt způsobuje zároveň zpětnovazebnou inhibici nebo intracelulární degradaci, odstraněním a sekvestrací produktu v těchto uměle vytvořených kompartmentech může zvýšit celkový výtěžek. Takovýto dvoufázový systém dokáže akumulovat dokonce jen stopy sekundárních metabolitů z kultivačního média a vyhne se tak zpětnovazebné inhibici. Dalším přínosem je možnost vylepšení uvolňování sekundárních metabolitů z kultury [30] [31].

Biotransformace - biotransformace patří k velmi perspektivním metodám z hlediska ovlivnění produkce sekundárních metabolitů. Více viz 3.2.4

3.2.4 Biotransformace

Pojem biotransformace zahrnuje přeměnu prekurzoru, resp. substrátu na produkt. Pokud požadujeme od kultury dané sloučeniny, přidávají se prekurzory těchto sloučenin ke kultuře a po určitém čase se odebírají produkty transformace [2] [22]. Schopnost buněčných rostlinných kultur biotransformovat exogenně přidávané sloučeniny nabízí velký potenciál vzhledem k přirozeným a syntetickým chemikáliím [30] [32] . Rostlinné enzymy jsou schopné katalyzovat regio- a stereospecifické reakce, proto jsou využívány při získávání požadovaných produktů [30]. Např. buněčné kultury *Nicotiana tabacum* redukují monoterpen menthon ve

formě S-menthonu a neakceptují isomer (iso-menthon) [12] nebo buněčná kultura *Phytolacca americana*, která dokáže redukovat keton a zingeron maliníku a regioselektivně je hydroxylovat a glukosylovat na ß-glykosidy [33]. Rostlinné buněčné kultury mohou také posloužit jako modelový systém pro studium metabolických drah [30]. Znalost metabolických drah usnadňuje nalezení vhodných prekurzorů, které umožňuje syntézu žádané látky zvýšit [2].

Zenk et al. [34] uvádějí základní podmínky pro zabudování prekurzoru do žádaného produktu :

- přítomnost enzymu schopného inkorporace prekurzoru
- produkt musí být tvořen rychleji než je metabolizován
- kultura musí dodávaný prekurzor tolerovat

Jako substráty pro biotransformace se mohou využívat [35]:

1. Látky rostlině obvykle nedostupné, tj. syntetické látky, chemické analogy či sekundární metabolity jiných rostlinných druhů, jejichž transformaci lze vysvětlit jako detoxikační reakci. Příkladem těchto substrátů je biokonverze exogenně přidaného 3-demethylthiocolchicinu na thiocolchicosid suspenzní kulturou *Centella asiatica* [36], dále přeměna bufalinu na *3-epi*-telocinobufagin a *3-epi*-bufalin-3-O-ß-d-glukosid suspenzní kulturou *Platycodon grandiflorus* [37] nebo konverze prenylalkoholů (geranylgeraniol, farnesol, geraniol) na prenylkarboxylové kyseliny (kyselina geranylgeranoová, farnesoová, geranoová) suspenzní kulturou *Cucurbita maxima* [38].
2. "Přirozené substráty", tj. látky běžně se v rostlinách vyskytující . Příkladem je kultura *Digitalis lanata*, která dokáže biotransformovat kardioglykosidy s relativně vysokými výtěžky. Bylo zjištěno , že izolované a optimalizované buněčné kultury jsou schopny přeměnit 3-methyldigitoxin na vhodnější 3-methyldigoxin hydroxylací substrátu [12]. Nebo např. kultura odvozená z kořenových hlízek genotypu *Taxus x media "'Sargentii"* biotransformuje 10-deacetylbaccatin III (10-DAB) několikastupňovým procesem na taxol [39].

V mnoha případech vede dodání exogenních prekurzorů ke zvýšení biosyntézy produktu, na druhé straně ale u mnoha kultur zůstane přidání prekurzoru bez odezvy. V případě použití prekurzorů je nutno ověřit jejich akceptovatelnost, zjistit jejich optimální hladinu, kdy působí, a aplikovat je přesně v té růstové fázi, kdy jsou účinné [2].

Biotransformace může být realizována i kulturou, v níž je celá biosyntetická sekvence porušena, ale enzym schopný zprostředkovat žádanou dílčí reakci je tvořen v dostatečném množství [2]. Tak tomu je např. u kultury *Datura meteloides*, která dokáže po přidání hydrochinonu do živného média vytvořit arbutin, ačkoliv to není její přirozený sekundární metabolit a intaktní rostlina jej sama o sobě nikdy netvoří [11].

Tento přístup má zásadní význam ve farmaceutickém průmyslu, kde může v kombinaci s organickou syntézou usnadnit přípravu nových analogů známých léčiv, která by měla sníženou toxicitu či zvýšený terapeutický účinek, nebo pro využití některých surovin, jejichž chemické zpracování není možné nebo je ekonomicky nevýhodné [2].

3.3 Další využití explantátových kultur

Moderní zemědělské technologie stále častěji využívají explantátové kultury především v následujících oblastech :

- Ozdravování rostlin a produkce bezvirózního rostlinného materiálu.
- Masová produkce geneticky identického materiálu cestou mikropropagace.
- Rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd.
- Uchovávání genobanky jednotlivých druhů, kultivarů atd.
- Produkce haploidních rostlin jako výchozího materiálu pro šlechtitelské programy.

Z komerčních důvodů se explantátové kultury většinou uplatňují při mikropropagaci okrasných druhů rostlin a ovocnářsky významných druhů rostlin a zeleniny. [18]. Zde mohou být vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části (jako mikrospory, vajíčka, embrya jakož i jednotlivé buňky a protoplasty) krátkodobě kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny [40].

Aplikace explantátových kultur ve šlechtitelských programech se týká zejména genového inženýrství, kde se pracuje s rekombinantní DNA . Postupně byly vypracovány metody vnášení jen přesně vymezené genetické informace (jednotlivých genů) do vhodných buněk, s cílem doplnit danou odrůdu o žádané vlastnosti nebo snaha napravit určité negativní znaky (např. malá odolnost jinak velmi dobré odrůdy vůči některému patogenu) [18].

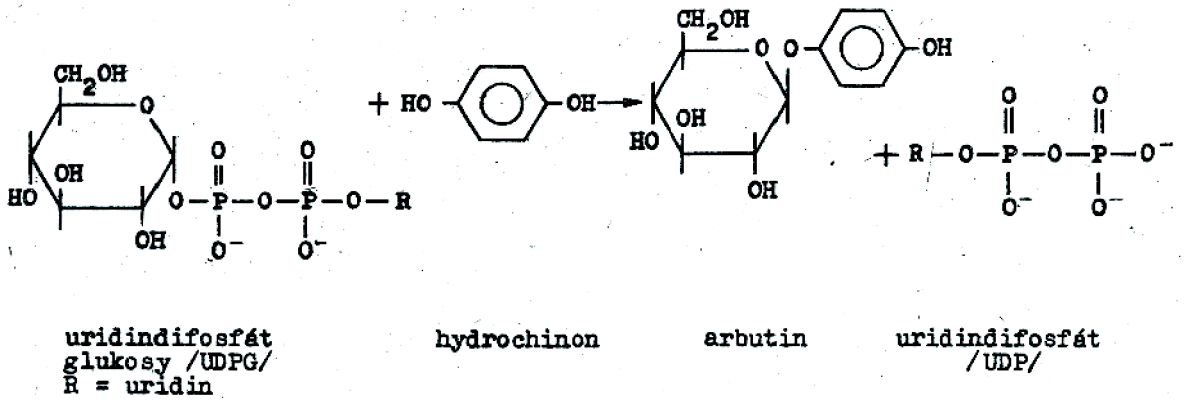
3.4 Arbutin

Arbutin je terapeuticky významný sekundární metabolit, který se svou strukturou řadí mezi fenolické glykosidy [2]. Glykosidy jsou látky skládající se z cukerné a necukerné složky. Necukerná část molekuly se nazývá aglykon či genin. Arbutin se tedy skládá z hydrochinonu jakožto necukerné složky a dále z D-glukózy (viz obr. 3.2) [23].

Aromatické jádro tohoto fenolického glykosidu je odvozeno od prekurzorů tvořených cestou kyseliny šikimové [23]. Do téže skupiny fenolických glykosidů jako arbutin patří glykosid salicin z drogy Salicis cortex (antirevmatikum). Některé počáteční prekurzory těchto glykosidů jsou shodné (viz obr. 3.3) [2].

Arbutin je obsahovou látkou drogy Uvae-ursi folium. Matečnou rostlinou je *Arctostaphylos uva-ursi (L.)* (medvědice léčivá) z čeledi *Ericaceae*. V listech této rostliny je podle původu a doby sběru obsažen v množství 3 - 12% [23].

Droga Uvae-ursi folium je součástí urologických čajových směsí, kde přítomný arbutin působí jako močové desinficiens [23]. Antimikrobiální účinnost arbutinu je však závislá na uvolnění hydrochinonu z molekuly. Arbutin lze rozštěpit působením ß-glukosidasy nebo kyselinami, a to na hydrochinon a D-glukosu. Patogenní bakterie způsobující infekce močových



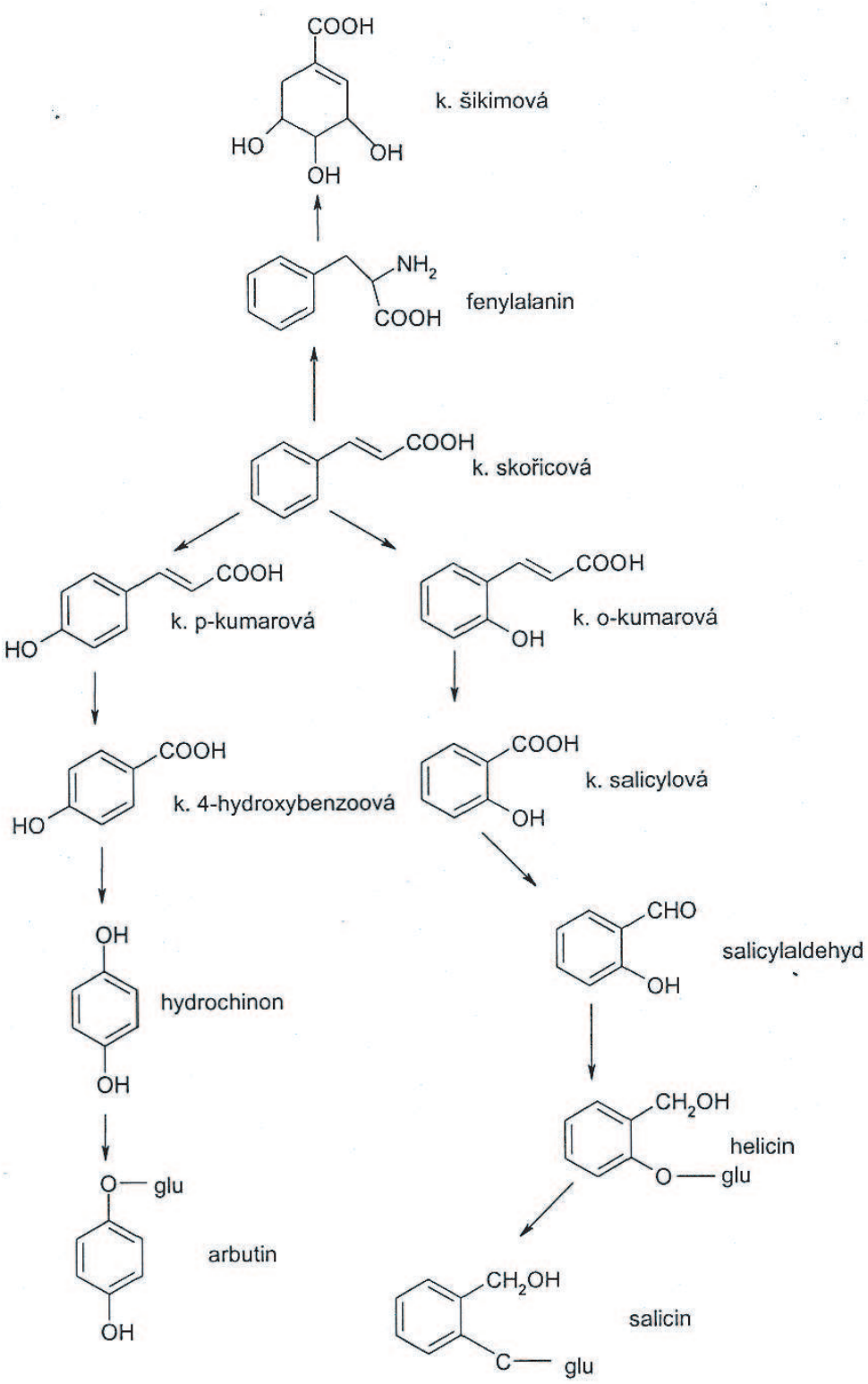
Obrázek 3.2: Tvorba arbutinu z hydrochinonu

cest se vyznačují ß-glukosidasovou aktivitou a pomocí autocidního působení na látku dokáží hydrochinon uvolnit. Byla zjištěna přímá závislost antibakteriálního působení arbutinu na stupni enzymové aktivity mikroorganismů [6].

Také byl prokázán antitussický efekt arbutinu [4].

Pro ženy asijských zemí se stává velmi atraktivní kosmetika obsahující látky zesvětlující kůži. Hyperpigmentace je způsobená nadměrnou syntézou melaninu. Prekurzorem melaninu je tyrosin a tato přeměna je zprostředkována enzymem tyrosinasou, která je limitujícím faktorem pro rychlost děje. Látky s podobnou strukturou jako tyrosin působí jako kompetitivní inhibitory tyrosinasy. A proto se využívají při léčbě abnormální pigmentace a jako látky zesvětlující kůži. Mezi inhibitory tyrosinasy patří právě arbutin, deoxyarbutin a nově také ester arbutinu a kyseliny undecylenové [41] [42].

Získání drogy Uvae-ursi folium z polních kultur je velmi obtížné, proto se výzkum zaměřil na získávání této biologicky aktivní látky z tkáňových kultur. Znalost metabolických drah usnadňuje nalezení vhodných prekurzorů, které umožní syntézu žádané látky. V intaktní rostlině *Arctostaphylos uva-ursi* je arbutin tvořen z tyrosinu přes kyselinu 4-hydroxybenzoovou a hydrochinon. Tkáňová kultura *Arctostaphylos uva-ursi* arbutin, methylarbutin ani jejich aglykony neprodukuje [9], proto se začaly k produkci těchto látek zkoušet jejich prekurzory (tyrosin, kyselina 4-hydroxybenzoová a hydrochinon). Byly testovány jejich různé koncentrace, nejvhodnější doba podání prekurzorů a různé časové intervaly působení prekurzorů. Bylo zjištěno, že v tkáňové kultuře *Arctostaphylos uva-ursi* neprobíhá dekarboxylace kyseliny 4-hydroxybenzoové na hydrochinon. Následná glykosylace hydrochinonu na arbutin byla prokázána [7]. Schopnost transformovat výše jmenované prekurzory na arbutin se podařilo dále prokázat u kultur *Datura meteloides, Datura innoxia, Rhodiola rosea, Rheum palmatum, Leuzea carthamoides,Leonurus cardiaca, Coronilla varia, Brassica oleracea, Bergenia crassifolia a Bellis perenis*, přičemž procento arbutinu dosažené transformací hydrochinonu kulturami rodu *Datura* odpovídá procentuálnímu obsahu v intaktní rostlině medvědice léčivé [10] [11]. Biotransformace hydrochinonu na arbutin byla popsána rovněž kulturami *Rauwolfia serpentina, Schizandra chinensis a Catharanthus roseus* [12] [13].



Obrázek 3.3: Biosyntetické pochody při tvorbě arbutinu a salicinu

Kapitola 4

Experimentální část

4.1 Přístroje

- Laboratorní analytické váhy AND Helado s.r.o.
- Přesné váhy Kern 572
- Horkovzdušný sterilizátor Chirana IP 21
- Box s laminárním prouděním Holten LaminAir (HV MINI)
- Sušárna Memmert
- Silufol ® UV 254 sklárny Kavalier, závod Votice
- UV lampa CAM AG
- UV/VIS detektor PU 4110 Philips
- Multichannel detektor DAD PU 4021 Philips
- Pumpa PU 4110 Philips
- Předkolona $30 \times 3\,mm$ CGC SGX C18, velikost částic $10\,\mu m$ (Tessek Praha)
- Kolona $250 \times 4\,mm$ Purospher Star RP-18 endcapped, velikost částic $5\,\mu m$ (Merc, Darmstadt)

4.2 Chemikálie

- 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, Merc
- N^6-benzyladenin, Merc
- 4-methoxyfenol, Fluka AG

- Arbutin pro laboratorní účely, Roth
- Methylarbutin izolovaný na katedře farmaceutické botaniky a ekologie
- Hydrochinon p.a., Lachema
- 4-aminoantipyrin čistý, Chemapol
- Hexakyanoželezitan draselný p.a., Lachema
- Amoniak vodný roztok min. 25% p.a., Lachema
- Methanol p.a., Lachema
- Chloroform p.a., Lachema
- Methanol gradient grade for liquid chromatography
- Ethanol 96%
- Glycin p.a., Lachema
- Kyselina nikotinová čistá, Lachema
- Thiamin hydrochlorid B.P., Koch-Light Laboratories Ltd.
- Pyridoxin hydrochlorid DAB 6, Loba Chemie
- Kyselina chlorovodíková, Lachema
- Myo-inositol, Sigma
- Hydrolyzát kaseinu, Sigma
- Sacharosa p.a., Lach-Ner
- Agar noble difco laboratories, Detroit

4.3 Použitý biologický materiál

Pro svou diplomovou práci jsem použila tkáňovou kulturu *Datura meteloides* (47.-49. pasáž), na níž jsou prováděny pokusy na katedře Farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy již řadu let.

Tuto kulturu jsem pěstovala na živném médiu dle Murashigeho a Shooga [43]:

Složení	Množství v mg/l
Makroprvky	
NH_4NO_3	1650,0
KNO_3	1900,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370,0
KH_2PO_4	170,0
Roztok komplexních solí železa	
Na_2EDTA	37,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
Mikroprvky	
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	11,5
KI	0,83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
Vitamíny	
Nikotinová kyselina	0,5
Pyridoxin · HCl	0,5
Thiamin · HCl	0,5
Glycin	2,0
Další přísady	
2,4-D	1,0
Sacharosa	30000,0
Hydrolyzát kaseinu	1000,0
Inositol	100,0

Tabulka 4.1: Použitý biologický materiál

4.4 Biotransformační pokusy

Experiment jsem zahájila odebráním kalusů kultury *Datura meteloides* kultivované 3 týdny na pevné živné půdě s přídavkem 2,4-D. Po mechanickém rozdrobnění jsem kalusy (vždy asi 1 cm^3) přenesla do tekutého živného média stejného složení. Do takto vzniklé suspenzní kultury jsem přidala prekurzor arbutinu-hydrochinon, a to ve dvou koncentracích (100 mg/l a 200 mg/l). Hydrochinon byl v kontaktu se vzorky jen po určitou dobu. Tato část pokusu probíhala na třepačkách, aby byly vzorky dostatečně provzdušněny, což je žádoucí pro optimální průběh biotransformační reakce.

Postupně jsem vzorky kultury z média odebírala po 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 hodinách tak, že odfiltrovaný kalus jsem nechala sušit a živné médium jsem podrobila TLC analýze.

Usušený a rozmělněný kalus jsem rozdělila podle časů a podle koncentrace hydrochinonu celkem do 14 zkumavek a poté jsem vzorky extrahovala. Získané extrakty jsem použila jednak k TLC analýze a jednak k HPLC analýze arbutinu.

Veškeré pokusy a analýzy byly prováděny také se slepými vzorky.

4.5 Analýza obsahových látek

Příprava extraktu: Odfiltrovaný kalus jsem na Petriho miskách sušila při pokojové teplotě. Poté jsem usušené vzorky odvážila (0,250g – viz tab. 4.2) a extrahovala 5 ml 96% ethanolu za studena po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách jsem vzorky přefiltrovala a extrakt nechala odpařit a provedla ztrátu sušením (viz tab. 4.3) .

Doba působení prekurzoru [h]	Navážka vzorku suchého kalusu [g] Prekurzor konc. 100mg/l	Navážka vzorku suchého kalusu[g] Prekurzor konc. 200mg/l
24	0,250	0,250
48	0,250	0,250
72	0,250	0,250
96	0,230	0,250
120	0,250	0,250
144	0,250	0,250
168	0,250	0,250

Tabulka 4.2: Navážky vzorků suchého kalusu . (Pozn.: Navážka u vzorku s koncentrací prekurzoru 100mg/l odebraná po 96 hodinách, byla pouze 0,230 g z důvodu nízkého přírůstku).

Doba působení prekurzoru [h]	Hmotnost suchého extraktu [g] Prekurzor konc. 100mg/l	Hmotnost suchého extraktu [g] Prekurzor konc. 200mg/l
24	0,0224	0,0351
48	0,0312	0,0365
72	0,0257	0,0383
96	0,0213	0,0358
120	0,0334	0,0421
144	0,0277	0,0421
168	0,0312	0,0412

Tabulka 4.3: Hmotnost suchých extraktů vzorků při použití prekurzorů o 2 koncentracích a jejich působení v 7 časových intervalech.

TLC analýza: Každý vzorek odpařeného extraktu jsem rozpustila v 1ml 96% ethanolu a provedla TLC analýzu na deskách Silufol ®. Vyvíjecí soustavu tvořila směs chloroformu : methanolu (75:25). Jako standardy jsem použila 0,1% methanolické roztoky arbutinu a hydrochinonu. Po vyvinutí chromatogramu jsem provedla postřik detekčními činidly :

1. 4-aminoantipyrinem (0,02 M vodný roztok)
2. 10% vodným roztokem amoniaku
3. 1% vodným roztokem hexakyanoželezitanu draselného

Stejnou vyvíjecí soustavou byla provedena TLC analýza již zmíněných živných půd pro kultivaci suspenzní kultury *Datura meteloides*.

HPLC analýza: K HPLC analýze jsem použila stejné vzorky, které sloužily k TLC analýze. Specifikace přístroje :

- Pumpa: Philips PU4100
- Detektor: Philips PU4110 UV/VIS
- Nástřiková klička: 20 μl, manuální nástřik
- Kolona: Merck, Lichrospher RP-18, velikost částic 5 μm, 250 $\times$ 4 mm
- Předkolona: Tessek, SGX C18, velikost částic 10 μm, CGC 30 $\times$ 3 mm
- Nástřik: 20 μl
- Vlnová délka: 285 nm
- Průtoková rychlost mobilní fáze: $0,5$ ml/min

Analýza byla provedena na základě gradientové eluce:

Fáze:	0 - 20 min	$5\% - 35\%$ acetonitril	/	$95\% - 65\% H_2O$
	20 - 21 min	$35\% - 80\%$ acetonitril	/	$65\% - 20\% H_2O$
	21 - 40 min	80% acetonitril	/	$20\% H_2O$

Kapitola 5

Výsledky

5.1 Výsledky TLC analýzy

Doba působení prekurzoru [h]	Arbutin	Methylarbutin	Hydrochinon	4-methoxyfenol
24	-	-	-	-
48	-	-	-	-
72	-	-	-	-
96	-	-	+	-
120	-	-	-	-
144	-	-	-	-
168	+	-	-	-

Tabulka 5.1: Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci suspenzních kultur *Datura meteloides*. Hydrochinon v konc. 100 mg/l.

Doba působení prekurzoru [h]	Arbutin	Methylarbutin	Hydrochinon	4-methoxyfenol
24	-	-	-	-
48	-	-	-	-
72	-	-	-	-
96	-	-	-	-
120	-	-	-	-
144	-	-	-	-
168	-	-	-	-

Tabulka 5.2: Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci suspenzních kultur *Datura meteloides*. Hydrochinon v konc. 200 mg/l.

Doba působení prekurzoru [h]	Arbutin	Hydrochinon
24	+	+
48	+	+
72	+	+
96	+	+
120	+	+
144	+	+
168	+	+

Tabulka 5.3: Výsledky TLC analýzy extraktů suspenzních kultur *Datura meteloides* . Hydrochinon o konc. 100 mg/l.

Doba působení prekurzoru [h]	Arbutin	Hydrochinon
24	+	+
48	+	+
72	+	+
96	+	+
120	+	+
144	+	+
168	+	+

Tabulka 5.4: Výsledky TLC analýzy extraktů suspenzních kultur *Datura meteloides* . Hydrochinon o konc. 200 mg/l.

5.2 Výsledky HPLC analýzy

Mon, 4th Feb, 2008 10:46:30 ARB2006 Page 1

arbutin - 7,218 min.

Peak Type : **Ordnr**

Left Window : **0,6 min.**

Right Window : **0,6 min.**

Response Base : **Area**

Curve Fit Type : **Linear**

Zero Type : **Curve from Zero**

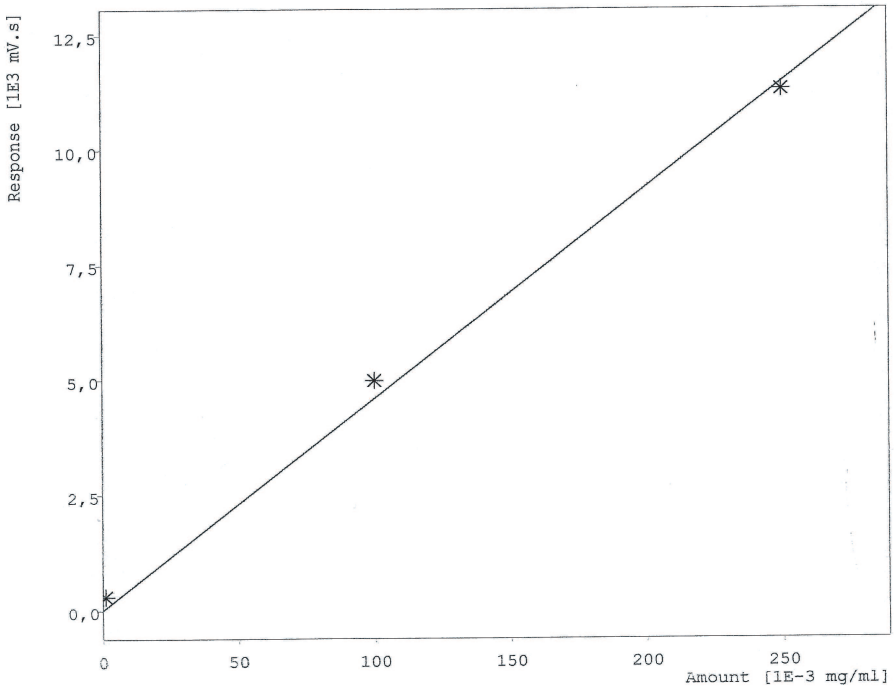
Subst. Equation : **Y = 45854,1 * X**

Correlation Coef. : **0,999354**

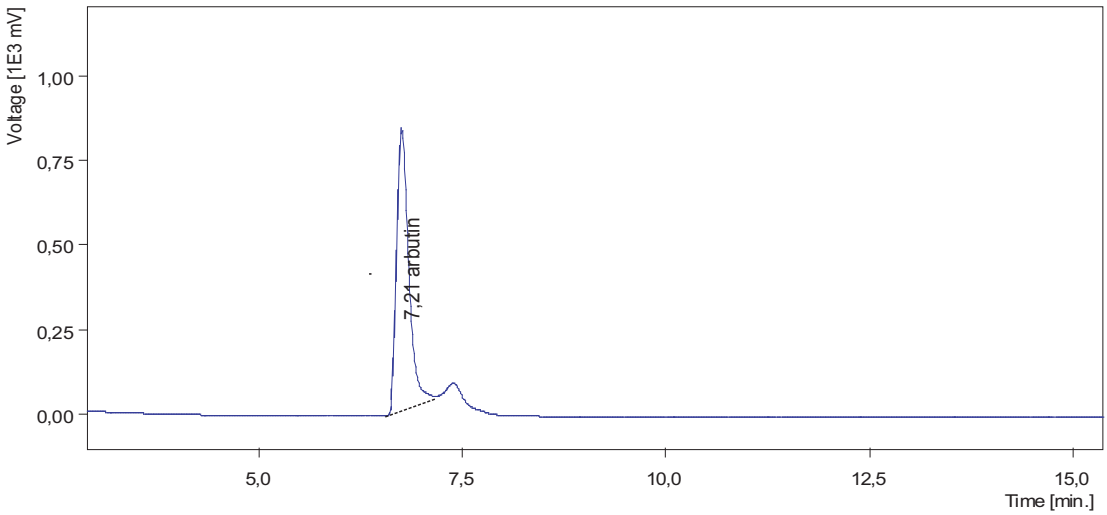
Saved Resp. Fact. : **0,00002345**

Substance Levels

Lv	Response	Amount	Lvl Res Factor
1	11306,1638	2,500E-01	2,2E-05
2	4976,4523	1,000E-01	2,0E-05
3	0	0	0
4	282,1542	1,000E-03	3,5E-06
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

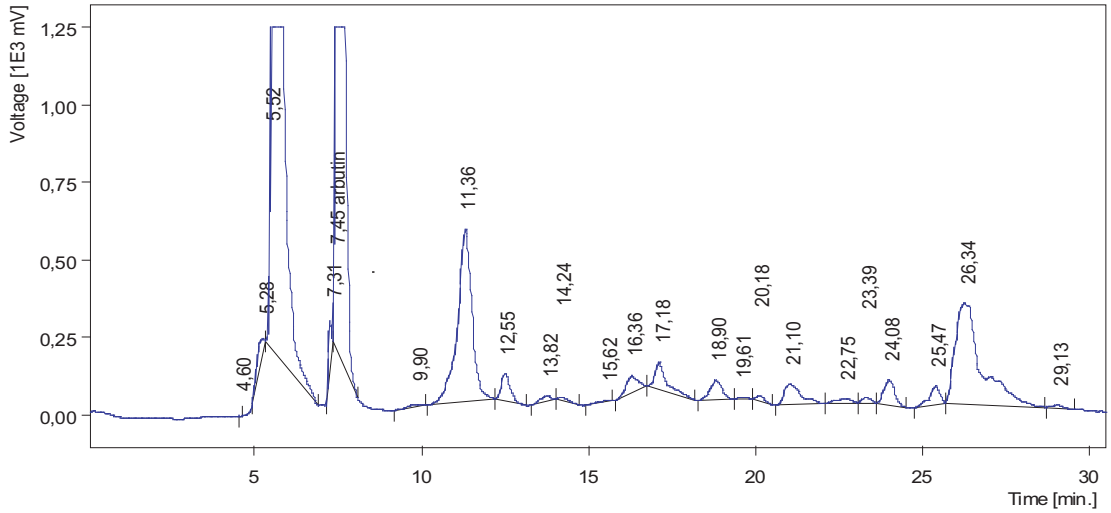


Obrázek 5.1: Kalibrační křivka arbutinu

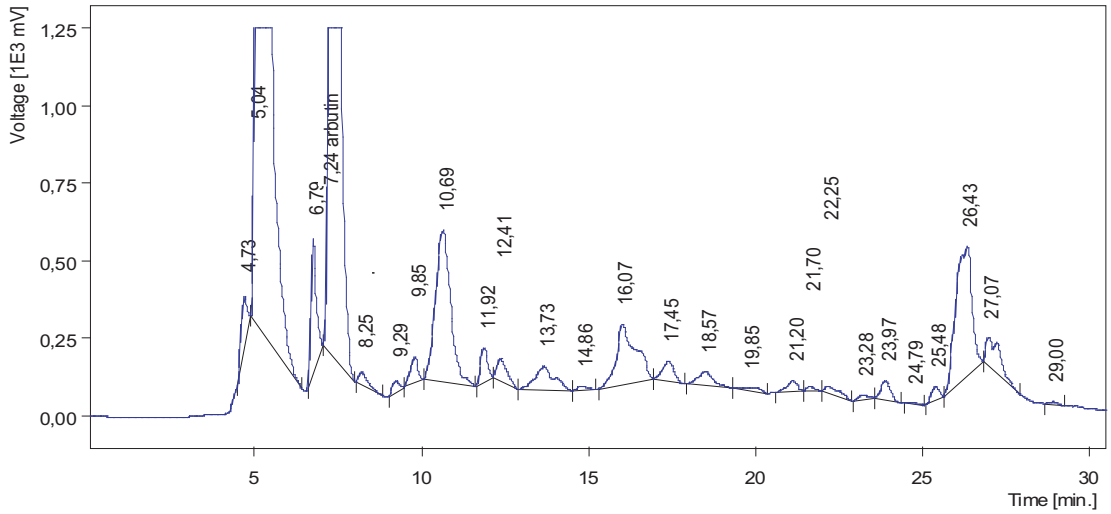


Obrázek 5.2: HPLC analýza standardu: arbutin

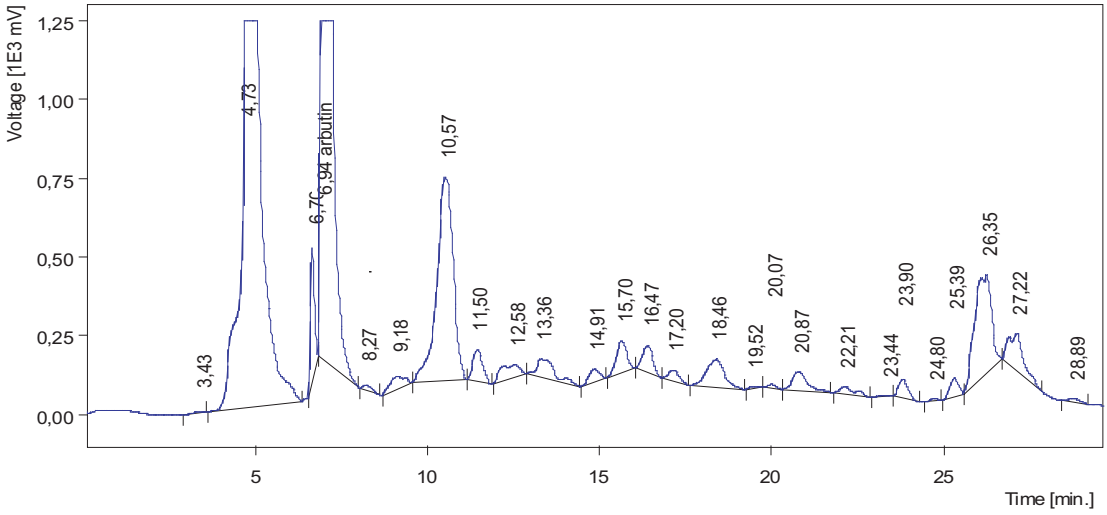
5.3 Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l



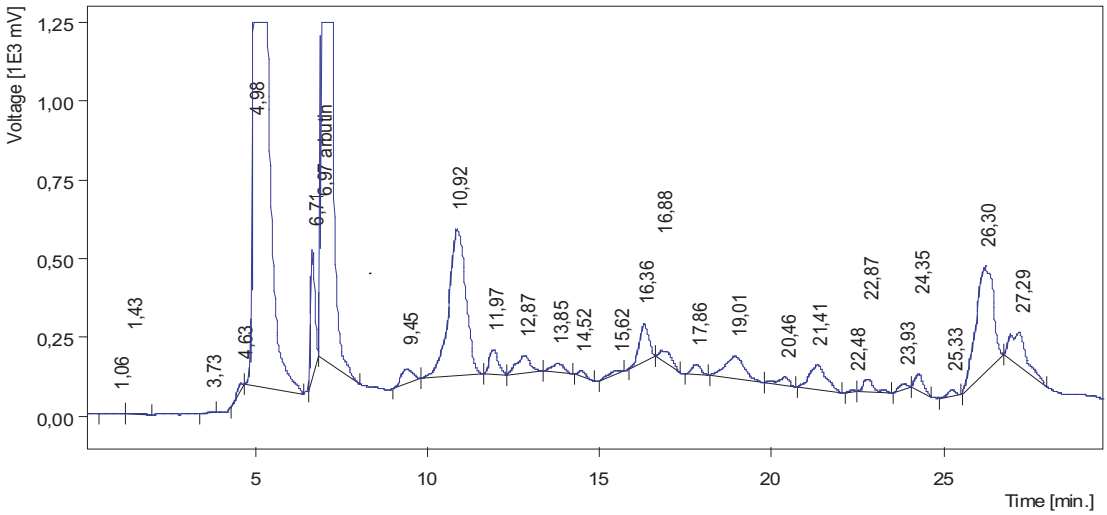
Obrázek 5.3: HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l. Doba působení prekurzoru - 24 h.



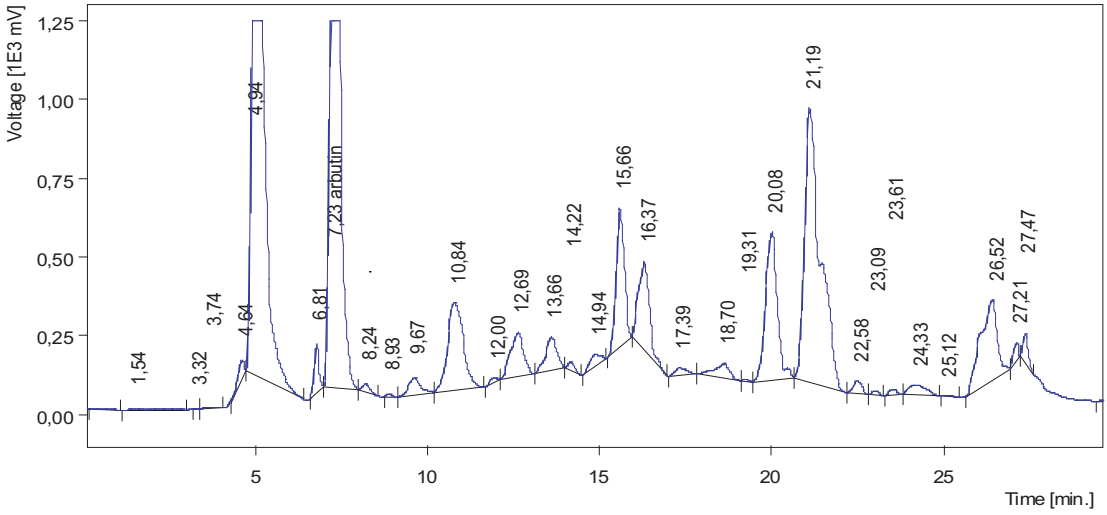
Obrázek 5.4: HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l. Doba působení prekurzoru - 48 h.



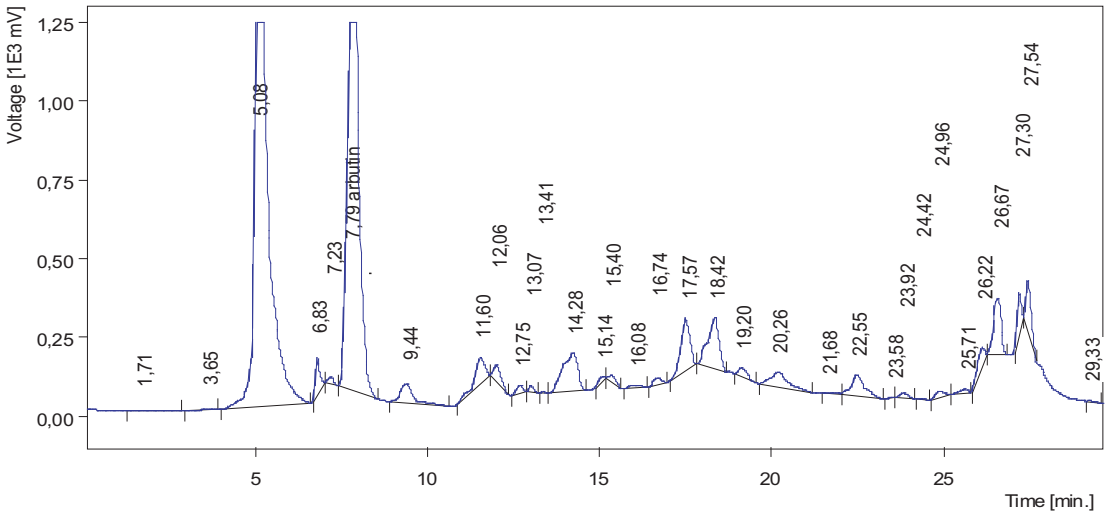
Obrázek 5.5: HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l. Doba působení prekurzoru - 72 h.



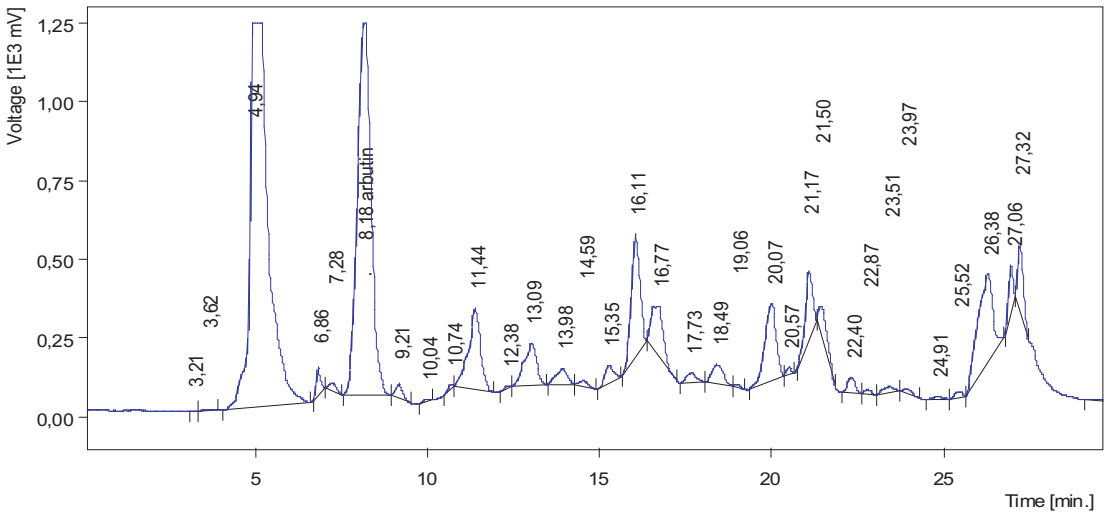
Obrázek 5.6: HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l. Doba působení prekurzoru - 96 h.



Obrázek 5.7: HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l. Doba působení prekurzoru - 120 h.



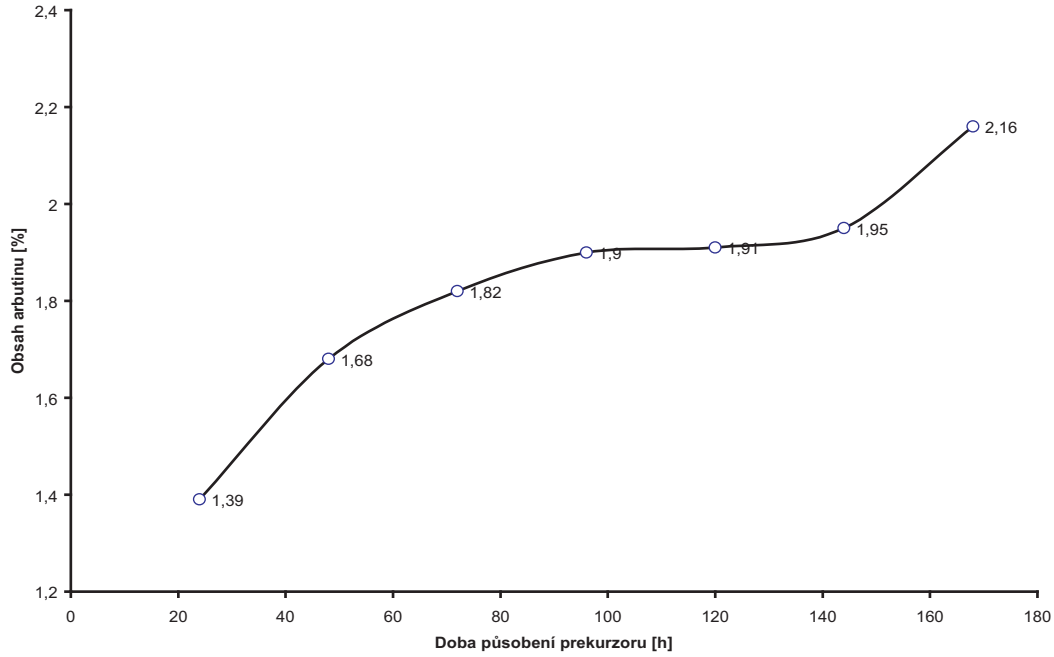
Obrázek 5.8: HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l. Doba působení prekurzoru - 144 h.



Obrázek 5.9: HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l. Doba působení prekurzoru - 168 h.

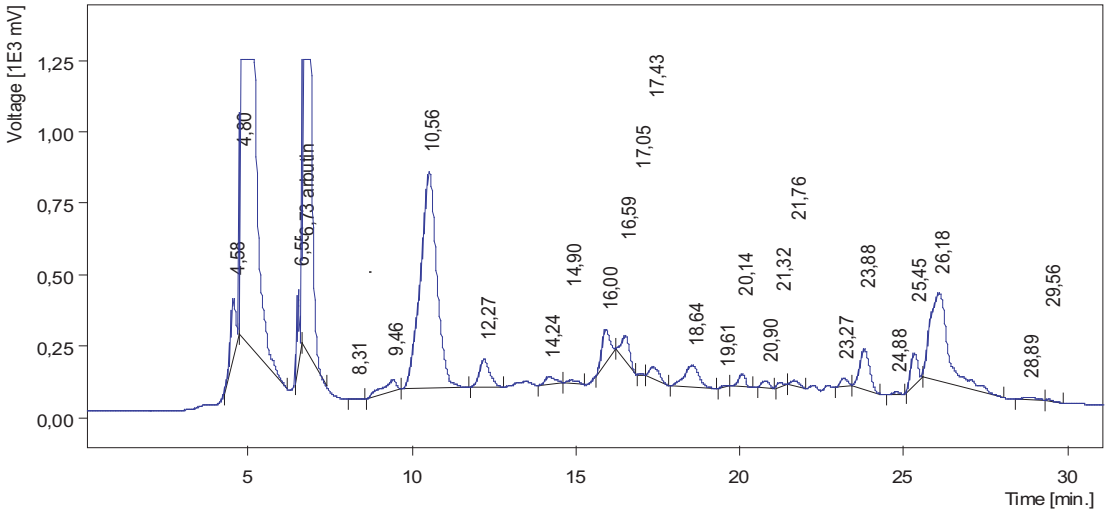
Doba působení prekurzoru [h]	Obsah arbutinu [g]
24	1,39
48	1,68
72	1,82
96	1,90
120	1,91
144	1,95
168	2,16

Tabulka 5.5: Výsledky HPLC analýzy extraktů suspenzních kultur *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 100 mg/l.

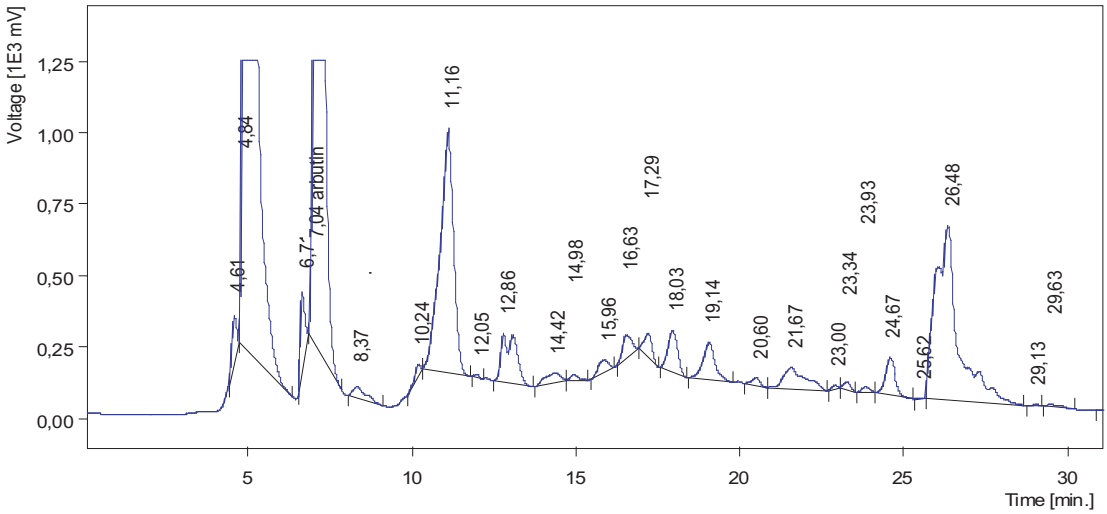


Obrázek 5.10: Graf závislosti množství arbutinu v extraktu suspenzní kultury *Datura meteloides* na délce kultivace za přítomnosti hydrochinonu o konc. 100 mg/l.

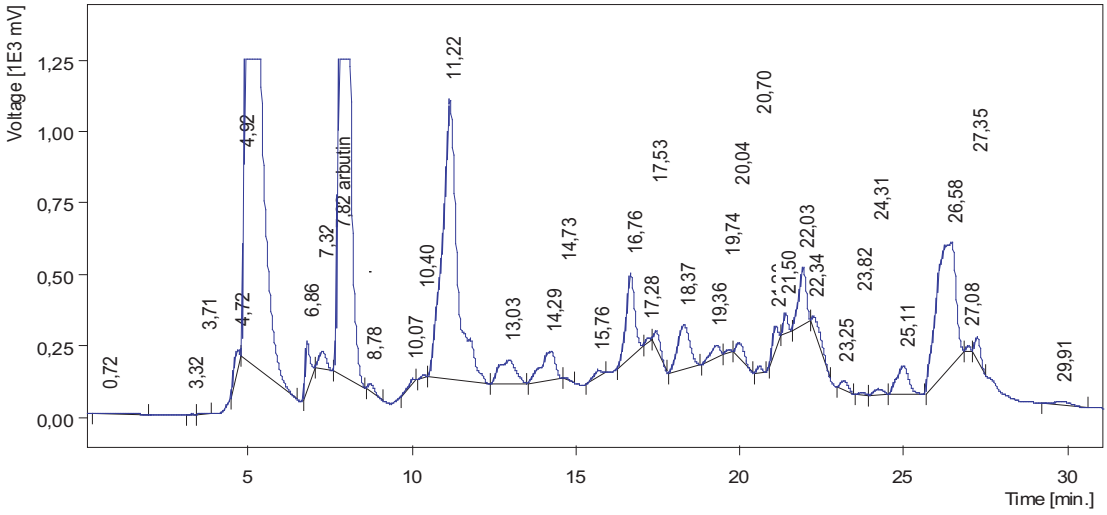
5.4 Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l



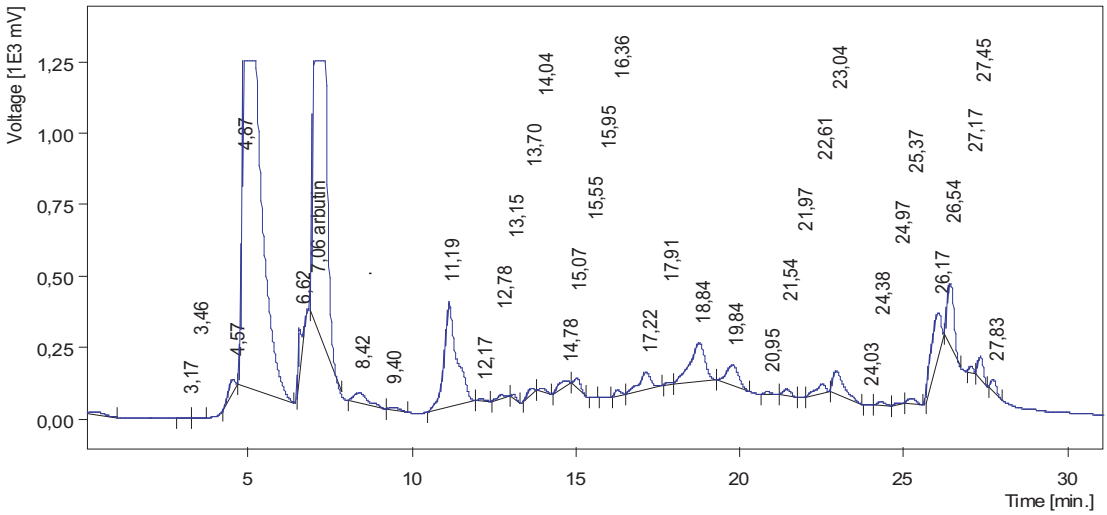
Obrázek 5.11: : HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l. Doba působení prekurzoru - 24 h.



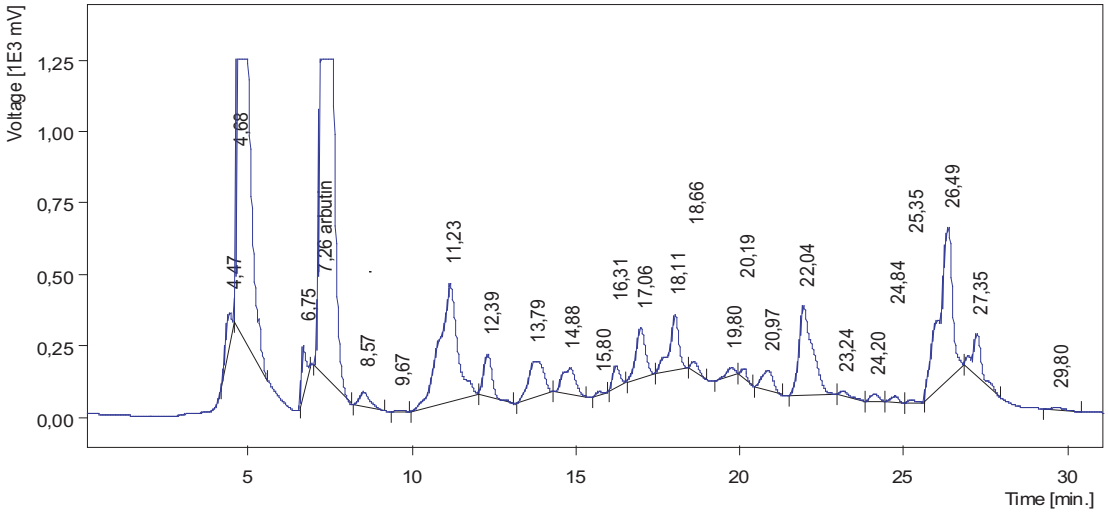
Obrázek 5.12: : HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l. Doba působení prekurzoru - 48 h.



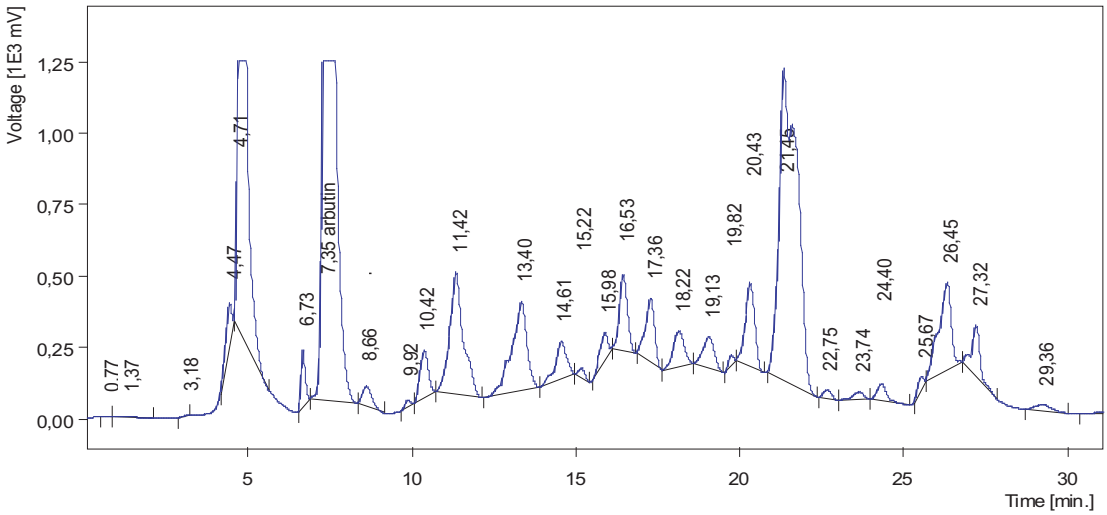
Obrázek 5.13: : HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l. Doba působení prekurzoru - 72 h.



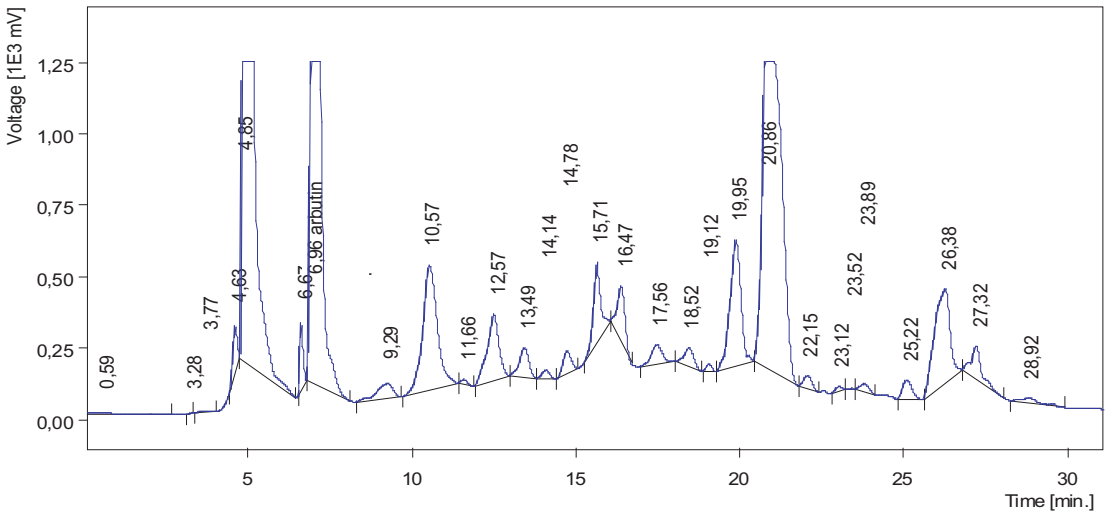
Obrázek 5.14: : HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l. Doba působení prekurzoru - 96 h.



Obrázek 5.15: : HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l. Doba působení prekurzoru - 120 h.



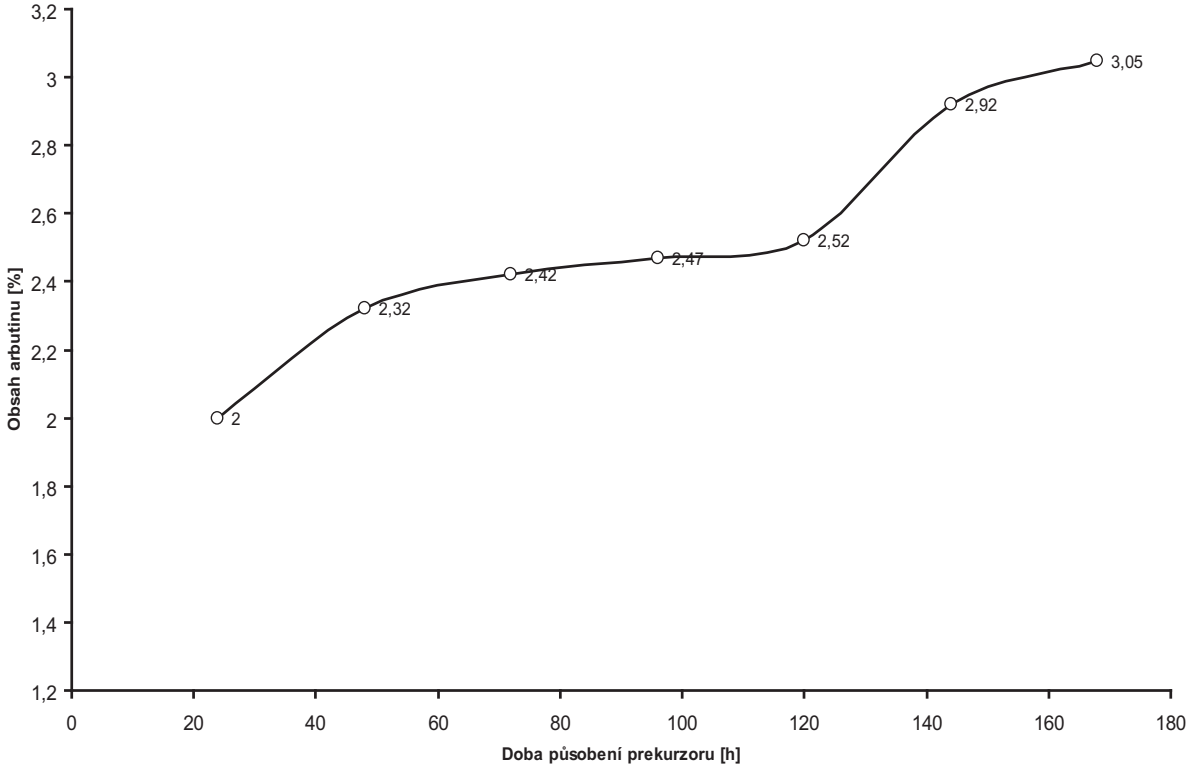
Obrázek 5.16: : HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l. Doba působení prekurzoru - 144 h.



Obrázek 5.17: : HPLC analýza suspenzní kultury *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l. Doba působení prekurzoru - 168 h.

Doba působení prekurzoru [h]	Obsah arbutinu [%]
24	2,00
48	2,32
72	2,42
96	2,47
120	2,52
144	2,92
168	3,05

Tabulka 5.6: Výsledky HPLC analýzy extraktů suspenzních kultur *Datura meteloides*. Prekurzor hydrochinon o konc. 200 mg/l.



Obrázek 5.18: Graf závislosti množství arbutinu v extraktu suspenzní kultury *Datura meteloides* na délce kultivace za přítomnosti hydrochinonu o konc. 200 mg/l.

Kapitola 6

Diskuze

Rostliny představují téměř neomezený zdroj fytochemických látek, zahrnující primární a sekundární metabolity. Velký zájem je především o sekundární metabolity díky jejich značné biologické aktivitě, která sahá od antimikrobiální, antibiotické, insekticidní, moluskocidní aktivity, přes vlastnosti hormonů až po vysoce důležité farmakologické vlastnosti [12].

Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo při získávání těchto sloučenin pomocí explantátových kultur *in vitro*. V současné době se zájem soustřeďuje nejen na nové biologicky aktivní látky z přírodních rostlinných zdrojů, ale řeší zvýšení omezené zásoby některých již známých, ale rostlinami málo produkovaných sloučenin se slibným farmakologickým účinkem [12].

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie se již řadu let zabývá využitím tkáňových kultur v produkci sekundárních metabolitů a řeší problematiku možnosti ovlivňovat tento proces.

Úkolem mé práce bylo sledování biotransformačních schopností tkáňové kultury *Datura meteloides* po přidání exogenního prekurzoru arbutinu - hydrochinonu. K pokusům jsem použila kalusové kultury kultivované na živném médiu podle Murashigeho a Shooga [43] s přídavkem 2,4-D (1,0 mg/l).

Pokus jsem započala odvozením suspenzní kultury, do které jsem za sterilních podmínek přidala roztok prekurzoru (hydrochinon), který jsem si připravila ve dvou koncentracích - 100 mg/l a 200 mg/l. Mohla jsem tak paralelně sledovat vliv různých koncentrací prekurzoru. Kultivace probíhala za světla v tekutém živném médiu stejného složení.

Vzorky suspenzních kultur jsem odebírala vždy v časových intervalech - po 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 hodinách od aplikace prekurzoru.

Připravila jsem si extrakty ze vzorků kalusu a podrobila jsem je kvalitativní a kvantitativní analýze. Ze živných médií jsem odebrala vzorky a provedla kvalitativní analýzu.

Kvalitativní analýzu extraktů jsem prováděla pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Ze sledovaných metabolitů jsem prokázala ve všech vzorcích u obou koncentrací prekurzoru přítomnost arbutinu i hydrochinonu. Znamená to tedy, že biotransformace hydrochinonu na arbutin neproběhla kompletně (viz tab. 5.3 a tab. 5.4).

Ve vzorcích živných médií jsem TLC analýzou zjistila přítomnost hydrochinonu (kultura kultivovaná 96 hodin v přítomnosti prekurzoru hydrochinonu 100 mg/l) a dále arbutinu (kultura kultivovaná 168 hodin v přítomnosti prekurzoru hydrochinon 100 mg/l). Vzniklý arbutin zřejmě suspenzní kultury neuvolnily do živného média.

Kvantitativní analýzu extraktů jsem prováděla pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která potvrdila přítomnost sledovaného metabolitu arbutinu. Vzorek s prekurzorem o koncentraci 100 mg/l odebraný po 24 hodinách obsahoval 1,39 % arbutinu a vzorek odebraný po 168 hodinách obsahoval 2,16 % arbutinu. V případě koncentrace prekurzoru 200 mg/l obsahoval vzorek odebraný po 24 hodinách 2,00 % arbutinu a vzorek odebraný po 168 hodinách 3,05 % arbutinu. Z toho tedy vyplývá, že množství vzniklého metabolitu se zvyšuje se vrůstající dobou kultivace v přítomnosti prekurzoru a je také vyšší v přítomnosti větší koncentrace prekurzoru (viz tab. 5.5 a tab 5.6). Dalšího zvýšení produkce arbutinu by bylo možné dosáhnout prodloužením doby působení prekurzoru na tkáňovou kulturu či zvýšení koncentrace prekurzoru, pokud by tato zvýšená koncentrace nepůsobila na kulturu toxicky.

Současně se mnou prováděla tentýž pokus Krajčová, ovšem s tím rozdílem, že tkáňové kultury s exogenně přidaným prekurzorem kultivovala na můstcích z filtračního papíru v tekutém živném médiu. Při srovnání výsledků HPLC mé práce s výsledky HPLC Krajčové jsem zjistila velký rozdíl v procentuálním obsahu arbutinu, kdy za použití suspenzní kultury byl arbutin získán v mnohem vyšší koncentraci než za použití můstkové metody. Vzorek s prekurzorem o koncentraci 100 mg/l odebraný po 24 hodinách z můstkové kultury obsahoval 0,029 % arbutinu a vzorek odebraný po 168 hodinách obsahoval 0,41 % arbutinu. V případě koncentrace prekurzoru 200 mg/l obsahoval vzorek odebraný po 24 hodinách 0,25 % arbutinu a vzorek odebraný po 168 hodinách 1,09 % arbutinu [44]. Důvodem je zřejmě kontakt živné půdy s tkáňovou kulturou. V případě suspenzní kultury je celý kalus v kontaktu s médiem a tedy i s prekurzorem. U můstků musí médium vzlínat po filtračním papíru a prekurzor se dostává do kontaktu jen s omezenou vnější částí kalusu. I v tomto případě se koncentrace arbutinu zvyšovala s koncentrací a s dobou působení prekurzoru.

V předchozích letech byla na katedře zkoumána schopnost biotransformovat exogenně přidaný hydrochinon, tyrosin a 4-hydroxybenzoovou kyselinu na arbutin tkáňovou kulturami *Datura meteloides* a *Datura innoxia*. Zjistila se závislost glukosylačních schopností na typu a na koncentraci růstových látek dodaných do média. K tomuto účelu posloužily paralelní kultury s přidanou kyselinou α-naftyloctovou (NAA), β-indolyloctovou (IAA), 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2,4-D) a β-indolylmáselnou (IBA) v koncentracích 0,1; 1,0 a 10,0 mg/l. Kultura *Datura meteloides* vyprodukovala v přítomnosti prekurzoru (hydrochinon 100 mg/l) na živné půdě s přídavkem 2,4-D 7,4 % arbutinu, což odpovídá obsahu oficinální drogy Uvae-ursi folium, který požaduje Český lékopis 2005 [10].

Schopnost biotransformace těchto prekurzorů na arbutin byla prokázána také u tkáňových kultur *Bellis perennis, Bergenia crassifolia, Brassica oleracea, Coronilla varia, Leonurus cardiaca, Leuzea carthamoides, Rheum palmatum, Rhodiola rosea [11], Centella asiatica [45], Rauwolfia serpentina, Catharanthus roseus [12] [13] nebo Schizandra chinensis* [2].

Možnost získávat arbutin pomocí tkáňových kultur a zvyšování jeho výtěžku ovlivňová-

ním různých faktorů je stále otevřené téma pro výzkumnou činnost.

Obecně je tato metoda velmi nadějná a přínosná vzhledem k ojedinělému výskytu divoce rostoucích rostlin a jejich ochraně a také je to jedna z možností jak zabránit totálnímu vyhubení několika tisícům druhů rostlin v důsledku jejich spotřeby jako suroviny pro výrobu léčiv [2].

Kapitola 7

Závěr

1. Byla prokázána schopnost suspenzní kultury *Datura meteloides* glukosylovat exogenně přidaný hydrochinon na arbutin.
2. Arbutin byl detekován pomocí TLC a HPLC analýzy u všech vzorků,bez ohledu na koncentraci prekursoru a délku jeho působení.
3. Na základě výsledků HPLC analýzy byla prokázána závislost produkce arbutinu na koncentraci prekurzoru (při vyšší koncentraci vyšší produkce arbutinu).
4. Dále byla prokázána závislost produkce arbutinu na době působení prekurzoru (se stoupající délkou působení prekursoru stoupá i produkce arbutinu).

Literatura

[1] Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: *Farmakognosie I.* Univerzita Karlova, Praha, 1989.

[2] Dušková, J., Dušek, J., Jahodář, L., Poustka, F.: Arbutin, salicin – možnosti jejich biotechnologické produkce. In *Čes. slov. Farm. 54, 78*, 2005.

[3] Li, Sh., Liu, G., Zhang, Yi, Xu, J.: Experimental study on antitussive effect of arbutin. *Yaoxue Tongbao*, 17:720, 1982. In Chem. Abstr., 98, 1983, 119447.

[4] Strapková, A., Jahodář, L., Nosál'ová, G.: Antitussic effect of arbutin. *Pharmazie*, 46:611, 1991.

[5] Scarpa, A., Querci, A.: Depigmenting procedures and drugs employed by melanoderm populations. *J. Ethnopharmacol*, 19:17, 1987.

[6] Jahodář, L., Jílek, P., Pátková, M., Dvořáková, V.: Antimikrobiální působení arbutinu a extraktu z listů medvědice léčivé in vitro. *Čes. slov. Farm.*, 34:174, 1985.

[7] Dušková, J., Jahodář, L., Dušek, J.: *Arctostaphylos uva-ursi (L.) spreng.* a cv. arbuta in vitro - studium vlivu prekursorů. *Čes. slov. Farm.*, 39:454, 1990.

[8] Opatrný, Z.: Množení a šlechtění rostlin metodou explantátových kultur. *Zemědělská škola*, 35:82, 1985.

[9] Dušková, J., Dušek, J.: Studium produkce vybraných metabolitů tkáňovou kulturou *Arctostaphylos uva-ursi (L.) spr.* a možnosti jejího ovlivnění. *Čes. slov. Farm.*, 38:257, 1989.

[10] Dušková, J., Jahodář, L., Dušek, J.: Neue möglichkeiten der production von arbutin durch gewebenkulturen. *Pharmazie*, 49:624, 1994.

[11] Dušková, J., Dušek, J., Jahodář, L.: Zur biotransformation von hydrochinon zu arbutin in den in vitro-kulturen. *Herba Pol.*, 45:23, 1999.

[12] Stöckigt, J., Obitz, P., Falkenhagen, H., Lutterbach, R., Endreß, S.: Natural products and enzymes of plant cell cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43:97, 1995.

[13] Yokoyama, M., Inomata, S., Seto, S., Yanagi, M.: Effects of sugars on the glucosylation of exogenous hydroquinone by *Catharanthus-roseus* cells in suspension-culture. *Plant Cell Physiol.*, 31:551, 1990.

[14] Kieran, P., M., MacLoughlin, P., F., Malone, M., D.: Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J. Biotechnol.*, 59:39, 1997.

[15] Sikyta, B.: *Biotechnologie ve farmacii.* Avicenum, Praha, 1987.

[16] Vaněk, T.: Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami vyšších rostlin. *Chem. listy*, 83:287, 1989.

[17] Řeřábek, J., Opatrný, Z.: Kultury rostlinných explantátů in vitro. *Biol. listy*, 36:214, 1971.

[18] Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin.* Univerzita Palackého, Olomouc, 1995.

[19] Verpoorte, R., Memelink, J.: Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:181, 2002.

[20] Harborne, J.B.: Twenty-five years of chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.*, 18:361, 2001.

[21] Dixon, R.A.: Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411:843, 2001.

[22] Mühlbach, H.P.: Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 4:113, 1998.

[23] Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J., Šícha, J.: *Obecná farmakognosie II.* Univerzita Karlova, Praha, 1978.

[24] Barešová, H.: Produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách rostlin. *Biol. listy*, 51:103, 1986.

[25] Attard, E.G., Scicluna-Spiter, A.: *Ecballium elaterium*: an in vitro source of cucurbitacins. *Fitoterapia*, 72:46, 2001.

[26] Takayama, H., Kitajima, M., Suda, S., Aimi, N., Sakai, S.: Structure and synthesis of a new indol alkaloid, 19-(s)-hydroxy-nb-methylraumacline, obtained by the biotransformation of ajmaline in plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina Benth. Tetrahedron*, 48:2627, 1992.

[27] Woerdenbag, H.J., Luers, J., Vanuden, W., Pras, N., Malingre, M., T., Alfermann, W., A.: Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua. Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 32:247, 1993.

[28] Verpoorte, R., van der Heyden, R., Hoopen, H.J.G., Memelink, J.: Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.*, 21:470, 1999.

[29] Furuya, T., Ishii, T.: *Japan Patent 7 938 199.* 1979.

[30] Dörnenburg, H., Knorr, D.: Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb. Technol.*, 17:676, 1995.

[31] Strobel, J., Hieke, M., Gröger, D.: Increased anthraquinone production in *Galium verum* cell cultures induced by polymeric adsorbents. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 24:207, 1991.

[32] Stöckigt, J.: Biotransformations with cultivated plant cells. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, 4:25, 1993.

[33] Shimoda, K., Harada, T., Hamada, H., Nakajima, N., Hamada, H.: Biotransformation of raspberry ketone and zingerone by cultured cells of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry*, 68:487, 2007.

[34] Zenk, M.H., El-Shagi, H., Stöckigt, J., Weiler, W., E., Deus, B.: Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In Bartz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application, Springer Verlag, Berlin, p.27, 1997.

[35] Dušek, J., Dušková, J., Tůmová, L., Spilková, J.: Biotechnologické využití kultur vyšších rostlin in vitro. *Čes. slov. Farm.*, 45:209, 1996.

[36] Bouhouche, N., Solet, J.M., Simon-Ramiasa, A., Bonaly, J., Cosson, L.: Conversion of 3-demethylthiocolchicine into thiocolchicosid by *Centella asiatica* suspension cultures. *Phytochemistry*, 47:743, 1998.

[37] Zhao, J., Guan, S.H., Chen, X.B., Wang, W., Ye, M, Guo, D.A.: Two new compounds derived from bufalin. *Chinese Chem. Lett.*, 18:1316, 2007.

[38] Nagaki, M., Imaruoka, H., Kawakami, J., Saga, K., Kitahara, H., Sagami, H. , Oba, R., Ohya, N., Koyama, T.: Biotransformation of prenylalcohols by cultured cells of *Cucurbita maxima*. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 47:33, 2007.

[39] Parc, G., Canaguier, A., Landré, P., Hocquemiller, R., Chriqui, D., Meyer, M.: Production of taxoids with biological activity by plants and callus from selected *Taxus* genotypes. *Phytochemistry*, 59:725, 2002.

[40] Kováč, J.: Tkáňové kultury a jejich využití k mikropropagaci rostlin. *Přírodní vědy*, 42:122, 1991.

[41] Boissy Raimond, E., Visscher, M., DeLong Mitchell, A.: Deoxyarbutin: a novel reverzible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. *Exp. Dermatol.*, 14(8):601, 2005.

[42] Yutaku, T., Masaru, K., Takao, R., Shusaku, Y., Kenji, Y.: Enzymatic synthesis of arbutin undecylenic acid ester and its inhibitory effect on melanin synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17:3105, 2007.

[43] Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473, 1962.

[44] Krajčová, V.: *Explantátové kultury vyšších rostlin 29. (Diplomová práce)*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008.

[45] Lukášková, M.: *Explantátové kultury vyšších rostlin 28. (Diplomová práce)*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2007.

Abstrakt

Faltýnková, J.: Explantátové kultury vyšších rostlin 29. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008

Úkolem mé diplomové práce bylo ověření biotransformačních schopností tkáňové kultury *Datura meteloides* po přidání exogenního prekurzoru arbutinu - hydrochinonu. Studie probíhala paralelně jednak s prekurzorem o koncentraci 100 mg/l a jednak 200 mg/l. Doba působení obou koncentrací prekurzorů byla 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 hodin za neměnných podmínek. Pomocí kvalitativní a kvantitativní analýzy byla ve všech vzorcích prokázána přítomnost studovaného metabolitu arbutinu. Největší množství arbutinu bylo získáno po 168 hodinách kultivace s prekurzorem o koncentraci 200 mg/l (3,05%). Byla zjištěna závislost koncentrace arbutinu na koncentraci prekurzoru a zároveň na době působení prekurzoru.

Abstract

Faltýnková, J.: Explant cultures of higher plants 29. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2008

The goal of my thesis was to verify biotransformation posibility of the *Datura meteloides* culture. Hydroquine - the precursor of arbutin was added into these cultures. Precursor used in this study was prepared in concentration of 100 mg/l and 200 mg/l. Exposition of precursor was 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours under constant conditions. By the qualitative and quantitative analysis I found the presence of studyied arbutin metabolite in all observed samples. The biggest arbutin volume was obtained after 168 hours of cultivation with precursor of concentration at 200 mg/l (3,05%). The influence of precursor's concentration and exposition time to the final product was thereby confirmed.