

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY
A EKOLOGIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Explantátové kultury vyšších rostlin 24

Děkuji

pomocí

Součástí

práci

kapaliny

Hradec Králové 2006

Veselá Jana

OBSAH

1. Úvod
2. Řešená problematika
3. Teoretická část
 - 3.1. Botanická a fytochemická charakteristika studovaného taxonu
 - 3.2. Explantátové kultury
 - 3.3. Biotransformace
 - 3.4. Produkce sekundárních metabolitů kulturami in vitro
 - 3.5. Arbutin – biosyntéza, terapeutické využití
4. Experimentální část
 - 4.1. Přístroje
 - 4.2. Chemikálie
 - 4.3. Použitý biologický materiál a zakládání kultur
 - 4.4. Biotransformační pokusy
 - 4.5. Analýza obsahových látek
5. Výsledky
 - 5.1. Výsledky TLC analýzy
 - 5.2. Výsledky HPLC analýzy
6. Diskuse
7. Závěr
8. Literatura

1. Úvod

Rostliny můžeme považovat za dosud málo prozkoumanou oblast vědy a aplikovaného výzkumu. Ostatně o kolika věcech můžeme i přes obrovský technický pokrok s jistotou tvrdit, že je známe do nejmenšího detailu? Obvykle se časem ukáže, že tomu tak není, a je stále mnoho nezodpovězených otázek, které se zpravidla objeví s postupujícím výzkumem. Abychom mohli lépe poznat možnosti využití rostlin, musíme zpravidla začít pozorováním a zkoumáním toho „nejmenšího“ funkčního celku rostlin, totiž buňky. Právě rostlinné buněčné kultury se široce využívají ve vědeckých studiích zejména v takových oborech, jako je fyziologie, genetika, biochemie a molekulární biologie primárního a sekundárního metabolismu, regulace rozvoje a odpovědí buněk na nejrůznější patogeny a stresové faktory.

Explantátové kultury představují v dnešní době a zejména s ohledem na budoucnost klíč k manipulacím s genetickou výbavou vyšších rostlin na úrovni izolovaných buněk, pletiv a orgánů a celé rostliny, jinými slovy jde o nový pohled na systém šlechtění a rozmnožování rostlin. Další možností je nahradit rostliny explantátovými kulturami a získávat z nich látky potřebné ve farmacii.

Poměrně dlouhou dobu lidstvo vystačilo se sběrem rostlin ve volné přírodě a lze říci, že i v dnešní době u některých druhů rostlin stále tento způsob získávání drog dominuje. Sběr léčivých rostlin se dnes týká asi 70 druhů rostlin. Nevýhody, které jsou s tímto způsobem získávání drog spojeny, spatřujeme zejména v neustále se zvyšujících požadavcích na ochranu přírody, a také v ekonomické stránce věci, kdy rostou náklady práce sběračů, výkupní ceny a nepochybně nelze zcela vyloučit možnost záměny drogy.

Další možností získávání drog je jejich pěstování, které lze dělit na velkoplošné (např. tímto způsobem se sklízí *Carum carvi*, *Silybum marianum*, *Papaver somniferum*, *Claviceps purpurea*) a na maloplošné (*Mentha piperita*). Výhody plynoucí z pěstování rostlin zemědělským způsobem spatřujeme zejména ve vyšší kvalitě produkce, stabilnějších výnosech a efektivnější ochraně kultur před nejrůznějšími škodlivými vlivy. Další výhody spočívají v možnosti efektivního využití nejrůznější mechanizace a v neposlední řadě též ve snížení množství záměn oproti klasickému sběru drog ve volné přírodě.

Naopak nevýhody pěstování drog zemědělským způsobem spatřujeme ve zvýšeném riziku nebezpečí napadení kultur nejrůznějšími chorobami a hmyzem. Při ochranném postřiku proti škůdcům a plevelům zůstávají v rostlinných tělech rezidua herbicidů. Značnou nevýhodou pěstování je proměnlivost klimatických podmínek a dále, že některé rostliny vyžadují k růstu určité specifické stanoviště, aby výnosy drog byly ekonomicky přijatelné.

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které závažně ohrožují rostliny, označujeme jako stresové faktory. Stresové faktory, se kterými se rostliny setkávají v přírodě, lze rozdělit na následující:

a) abiotické faktory – fyzikální: mechanické účinky větru

nadměrné záření UV

extrémní teploty

nadmořská výška

proudění vzduchu

– chemické: voda

nedostatek kyslíku

nedostatek živin v půdě

nadbytek iontů solí a vodíku v půdě

toxické kovy a organické látky v půdě

b) biotické faktory – herbivorní živočichové (spásání, poranění)

patogenní mikroorganismy (viry, mikrobi, houby)

vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus)/1/

Některé stresové faktory mají logicky i přímou souvislost s kvalitou a kvantitou farmaceutických látek, sekundárních metabolitů. K těmto faktorům patří zejména teplota, která má významný vliv na vývoj a metabolismus rostlin.

Dalším faktorem je světlo, jeho intenzita, vlnová délka, fotoperioda, délka dne. Změny těchto hodnot jsou rovněž patrné na kvalitě produktů sekundárního metabolismu.

Doplňování zásob vody srážkami bývá nepravidelné a náhodné. To má za následek změny v rychlosti mnoha procesů, dochází např. ke zrychlení hydrolýzy škrobu či naopak ke zpomalení redukce nitrátu. Dále je snížena tvorba cytokininů a zpomaluje se buněčné dělení a tím pádem i růst rostliny. Jsou zde patrné velké rozdíly nejen v množství látek, ale i ve složení těchto látek, v závislosti na přísunu vody./1/

Nadmořská výška je faktorem, který ovlivňuje biosyntézu některých látek. Svou roli zde sehrává zejména teplota a intenzita UV záření (*Arnica montana*, *Gentiana lutea*)./1/

Při vyšší intenzitě proudění vzduchu dochází k určité ztrátě těkavých látek. Tuto skutečnost je možno zaznamenat, pokud v předsklizňovém období je vyšší rychlost proudění vzduchu; poté dochází ke snížení koncentrace silic v drogách.

Svůj význam má výživa rostlin ovlivňovaná mimo jiné i okyselením půd z stále častějším uvolňováním iontů těžkých kovů do půdy, zejména Cd, Pb, Cu, Hg, Zn a Ni. Podstata toxicity těžkých kovů pro rostliny spočívá v jejich vysoké afinitě k chemickým skupinám obsahujícím redukované formy síry, takže inaktivují enzymy s volnými skupinami –SH./1/

Ontogeneze rostlin hraje rovněž velmi výraznou úlohu v produkci rostlin. Jako příklad lze uvést rozdílné kvalitativní složení obsahových látek máty peprné (*Menhta piperita*), kde pozorujeme výrazný rozdíl ve složení silic u mladých (pulegon, menthofuran) a starších (menthol, menthylacetát) listů. /1/

Vzhledem k tomuto značnému množství nepříznivých faktorů, které nikterak nemůžeme ovlivnit, je celkem pochopitelné, že se lidé začali zajímat o alternativní způsob získávání sekundárních metabolitů, a to prostřednictvím explantátových kultur.

2. Řešená problematika

Úkolem mé diplomové práce bylo studium biotransformačních schopností kultury *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. po přidání exogenních prekurzorů arbutinu (hydrochinon, kyselina 4-hydroxybenzoová).

3. Teoretická část

3.1. Botanická a fytochemická charakteristika studovaného taxonu



Obr. 1: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., Klanopraška čínská



Obr. 2: Dvouletá sazenice



Obr. 3: Intaktní rostlina

Říše: Plantae
Oddělení: Magnoliophyta
Třída: Magnoliopsida
Podtřída: Magnoliidae
Řád: Illiciales
Čeleď: Schisandraceae
Rod: Schisandra
Druh: Schisandra chinensis

Makroskopický popis *Schisandra chinensis* (intaktní rostlina)

Schisandra chinensis je opadavá keřová liána dorůstající v našich podmínkách až šesti metrů. Její domovina se nachází podél řeky Amuru na Dálném východě, ve východní Číně a v Japonsku, zde při vhodných růstových podmínkách mohou její lodyhy dosahovat výšky až dvanácti metrů. Kůra rostliny je hladká, místy se olupuje a je barvy hnědočerné. Postavení listů na lodyze je lichopřeslenité a tvoří spirálu. Listy jsou jednoduché, celistvé, řapíkaté, na líci tmavěji zelené a na rubu světlejší barvy. Listová čepel je eliptická nebo opakvejitá a ke konci vybíhá ve špičku. Délka listu je až 10 cm a dosahuje šířky 3–5 cm. Okraj listu je mělce zoubkovaný. Řapík je červený až červenohnědý. /2/

Mladé rostlinky poměrně špatně rostou, zhruba 8 cm za rok, po čtyřech letech klanopraška vykvete bílými až narůžovělými vonnými květy. Květní pupeny se zakládají v létě a na podzim se tyto zárodky diferencují v květy o průměru 1–1,5 cm. Je to rostlina jednodomá (monoecie, samčí i samičí květy jsou na jednom jedinci). Květ je homochlamydní (květy s nerozlišeným květním obalem), tvoří perigon (okvětí) a uspořádání květních orgánů je ve spirále. Samčí i samičí květy jsou rozloženy po 2–7 v paždí pupenových zárodků na výhonech. Samičí květy mají apokarpní gyneceum (chorikarpní, jednotlivé plodolisty vzájemně nesrůstají), rostlina má 30–40 volných zelených plodolistů cyklicky rozložených na češuli ve formě šišky. Samčí květy mají 3 až 7 tyčinek, které jsou srostlé v synandriu (orgán, který vznikne srůstem

nitek a (nebo) prašníků) /3/. Plodem je bobule o průměru 5–10 mm, bobule jsou šarlatově červené a tvoří hroznovité souplodí, ve kterém se nachází od 4 do 40 bobulí. Každá z bobulí má jedno až dvě semena ledvinovitého tvaru 4 mm dlouhá, 3 mm široká a 2 mm tlustá. Semena mají tuhé a lesklé osemení a silný endosperm, uvnitř je malé embryo. /2, 3, 4, 5/

Fytochemická charakteristika

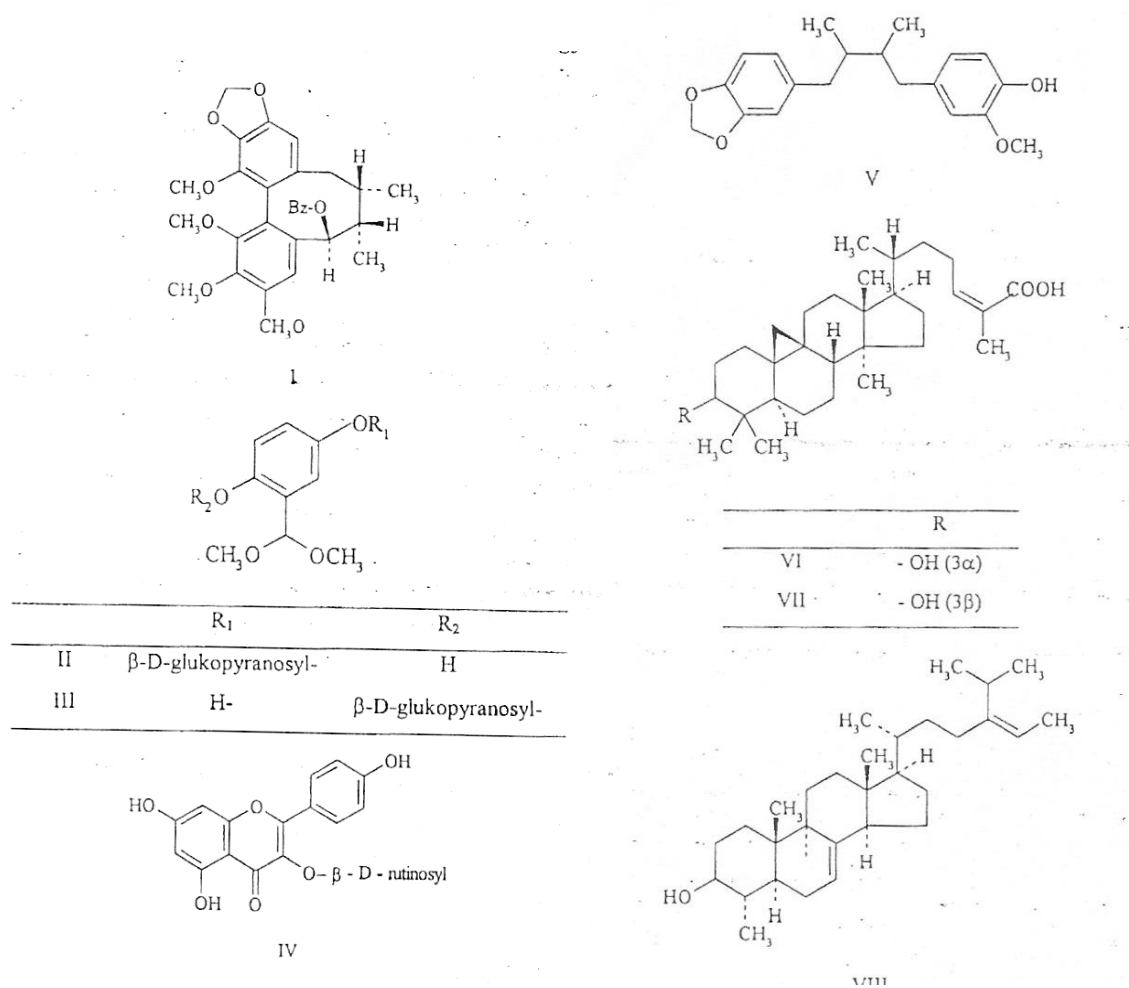
Schisandra chinensis obsahuje sekundární metabolity lignany, které se skládají ze dvou fenylypropanových jednotek. Analýzou lignanů v in vitro kultuře *Schisandra chinensis* se zabývali i Březinová et al. /6/ Stanovovali obsah lignanů v různých částech rostliny ve vzorcích in vitro kultury pomocí optimalizované HPLC metody. Ve své práci se zaměřili na analýzu dibenzocyklo(a,c)oktadienových lignanů. Nejvyšší obsah lignanů našli v semenech, hlavním lignanem semen byl schizandrin a gomisin A, viz níže. /6/

Z embryí semen byla odvozena in vitro kultura a obsah lignanů byl hodnocen ve všech fázích vývoje embrya. Hlavním lignanem ve vzorcích in vitro kultury byl deoxyschizandrin. Produkce lignanů kulturou byla významně zvýšena světlem a přidávkou polyaminu putrescinu (1,4-diaminobutan, tetramethyldiamin, mrtvolný jed ze skupiny ptomainů, vzniká dekarboxylací ornithinu). /6, 7/

Ze semen klanoprašky čínské byly izolovány mimo lignanů (dibenzo[a,c]cyklooktadieny) i terpeny, které jsou součástí silic. /8/

Z plodů byl izolován 6-O-benzoylgomisin O (I), 5-hydroxymethyl-2-furalaldehyd, sorbová kyselina a kyselina protokatechová. A další látky nacházející se v plodech, jsou následující: thymochinol 2-o- β -D-glukopyransoid (II), thymochinol 5-o- β -D-glukopyransoid (III), kemferol 3-o- β -rutinosid (IV), anwulignan (V). /9, 10, 11, 12/

Z drogy původem z Ličuanu (provincie Hubei) byly izolovány β -sitosterol, schisandrolová kyselina (VI), isoschisandrolová kyselina (VII), 2,3-dihydroxypropyloktadekanoat a citrostadienol (VIII). /13, 14/ viz obr.



Obr. 4: Chemické vzorce /4/

Stanovení obsahu lignanů v lodyze, kořenu a plodu *Schizandry chinensis* se provádělo metodou HPLC. Touto metodou se sledovala koncentrace obsahových látek, konkrétně devíti lignanů: schisandrinu, gomisinu A, schisantherinu A, deoxyschizandrinu, D-epigalbacinu, (+)-anwulignan, wuweizisu B, 6-o-benzoylgomisinu, wuweizisu C. Výsledkem sledování bylo, že obsah lignanů v plodech klanoprašky byl vyšší než v kořenech a lodyze. /15/

Metodou gelové sloupcové chromatografie a následnou spektroskopickou analýzou byly prvně izolovány obsahové látky, které se nacházejí v lodyze *Schisandra chinensis*, a to 3-β-O-acetylursolová kyselina, ursolová kyselina, glyceryl 26-hydroxyhexacosanoate. /16/

Farmakologické studie

Sušené plody *Schisandrae fructus* a semena *Schisandrae semen* jsou oficiální v lékopisu ruském, japonském a čínském. /17, 18, 19/

Nejvíce je droga používaná pro své významné hepatoprotektivní, antioxidační a adaptogenní účinky. Mezi další účinky, které mají z farmakologických testů spíše podpurný efekt k hlavním indikacím, patří následující: antibakteriální účinek, stimulace činnosti plic, dělohy, účinky kardiovaskulární, neuroleptické, antikonvulzivní a protizánětlivé účinky v gastrointestinálním traktu, imunostimulační, antineoplastický efekt a antihypertenzivní aktivita příznivě působí na metabolismus cholesterolu a lipidů. /20, 21, 22, 23, 24, 25/

Adaptogeny nazývané též stimulatory (biostimulatory) stimulují imunitu (především nespecifické obranné mechanismy organismu) a látkovou výměnu, jsou to prostředky, které zvyšují odolnost organismu, schopnost odolávat zátěži různého druhu, přizpůsobovat se rychleji nebo lépe změněným podmínkám. To znamená lépe odolávat stresům vznikajícím v důsledku zvýšených nároků na psychický nebo fyzický výkon, v důsledku nepříznivých klimatických podmínek, při překonávání potíží, kterým se dostalo pojmenování „civilizační faktory“. Adaptogenní účinek vykazují mimo *Schisandra chinensis* i další rostliny např. *Rhodiola rosea* a *Eleutherococcus senticosus*, *Aralia mandshurica*, *Leuzea carthamoides*, *Panax ginseng*.

Při studiu adaptogenního účinku klanoprašky byl podán standardizovaný extrakt z plodů několika skupinám atletů v dvojité zaslepené studii kontrolované placebem. Atleti se po podání extraktu nebo placebo podrobili nadměrné fyzické zátěži, při které se fyziologicky zvyšuje obsah oxidu dusnatého a hydrokortisonu v krvi a ve slinách. Výsledek studie ukázal, že u skupiny atletů, která dostala extrakt, nedošlo po fyzické zátěži k takovému zvýšení obsahu oxidu dusnatého a hydrokortisonu v krvi a slinách,

jako tomu bylo u kontrolní skupiny s placebem. Dochází tedy k ochrannému účinku adaptogenu vůči stresu. /26/

Pro již zmíněné hepatoprotektivní účinky byly studovány jednotlivé obsahové látky *Schisandra chinensis*. Velká pozornost byla věnována účinku gomisinu A. Tento lignan stabilizuje buněčné membrány jaterního parenchymu dokonce i v případě cytotoxických látek, zabraňuje uvolňování cytotoxických faktorů z aktivovaných jaterních adherentních buněk, stabilizuje membránu jaterních buněk v parenchymu. Tyto poznatky byly publikovány již v roce 1987 Tsutsui H. et al. /26/.

Gomisin A byl zkoumán na experimentálně navozeném jaterním poškození (za použití tepelně upraveného mikroorganismu *Propionibacterium acnes* a za použití lipopolysacharidového endotoxinu). Kromě již zmíněných účinků se prokázalo, že tato látka zabraňuje tkáňovým změnám, jako je degenerace a nekróza hepatocytů, zánětlivá buněčná infiltrace a nadměrné ukládání lipidů ve funkční tkáni. Stimuluje regeneraci jater po částečné hepatoktomii zvýšením aktivity ornithindekarboxylasy, což je biochemickým znakem časného stadia jaterní regenerace. /27/

Gomisin A inhibuje výskyt ložiskových změn pro placentární glutathion-S-transferasu (GST-P) v játrech samců potkana, kterým bylo s potravou podáno 0,06 % hepatokancerogenu 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzenu (3'-MeDAB). Podaný lignan (30 mg/kg/den p. o.) snížil koncentraci azobarviva v játrech a zvýšil jeho vylučování žlučí. Poměr diploidních k tetraploidním jádrům byl zvýšen v průběhu příjmu 3'-MeDAB, ovšem gomisin A toto zvýšení zpožďoval. Po eliminaci 3'-MeDAB nebyly v játrech ani ve žluči detekovány karcinogenní štěpné produkty azobarviva. Výsledky ukázaly, že účinky gomisinu A mají vztah ke zlepšení jaterních funkcí a brání zvratu k abnormální ploidizaci. /28/

Od lignanů klanoprašky byla připravena řada derivátů, které byly podrobeny studiu hepatoprotektivních účinků. Například syntetický analog schisandrinu, tzv. DDB (dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylen-dioxybifenyl-2,2'-dikarboxylat) působí proti jaternímu poškození způsobenému aflatoxinem b₁. /29/

U plodů *Schisandra chinensis*, stejně jako u jiných adaptogenů, byly nalezeny antioxidační účinky. Byla sledována „zametačová aktivita“ (FRSa) schisandrolu A a schisandrinu B na reaktivní kyslíkové radikály produkované lidskými polymorfonukleárními leukocyty, na hydroxylové radikály a superoxidové aniony a porovnávána s aktivitou vitamínu E a C (všechny látky byly v koncentraci 5×10^{-4} M). Obě látky měly FRSa na hydroxylové radikály vyšší než vitamíny, v případě superoxidových aniontů byla jejich aktivita vyšší než u vitamínu E, ale nižší než u vitamínu C. /30/ Antioxidační aktivitu má i gomisín N, který působí preventivně proti lipidové peroxidaci a pro zlepšení funkčního stavu arterií. Dále schisanhenol, který působí preventivně proti snížení pružnosti membrán jaterních mikrotomů. /31, 32/

Farmakologická studie účinku PEC (orální roztok obsahující *Panax quinquefolium*, *Epimedium brevicornum*, *Schisandra chinensis* a *Cervus eplaphus*) ukazuje, že při podávání roztoku PEC myším po dobu sedmi dnů v koncentracích 5–10 ml/kg dochází k výraznému zlepšení neuro-farmakologické aktivity, jinak řečeno dochází ke zlepšení kognitivních schopností myší. /33/

Plody *Schisandra chinensis* byly dlouhá léta využívány v Koreji pro léčbu kardiovaskulárních symptomů, které se objevují v období menopauzy. Tyto poznatky z lidové medicíny zaujali odborníky natolik, že se jim věnovalo hlubší zkoumání, a to na univerzitě Sejong v Koreji. Cílem práce bylo doložit spojitost mezi vazodilatačním účinkem na vénách a extraktem z plodů klanoprašky čínské. Pokusy byly prováděny na preparátech krysích aort. Céva, která byla kontrahována norepinefrinem (noradrenalinem), po aplikaci zmíněného extraktu vykazovala přechodnou relaxaci cévy. Výsledkem práce byl nový poznatek, že výtažky z plodů klanoprašky pracují jako slabý fytoestrogen. /34/

Extrakt z klanoprašky čínské byl použit i v následující směsi drog, výtažek z *Andrographis paniculata*, *Eleutherococcus senticosus*, *Schisandra chinensis* a *Glycyrrhiza glabra*. Tento výtažek už v prvopočátcích výzkumu sliboval imunomodulační účinky u tzv. středozevní horečky. Středozevní horečka neboli familiární paroxysmální polyserozitida je autozomálně recesivně dědičné onemocnění s paroxysmy vysoké horečky s peritonitidou (obvykle též s pleuritidou a

artritidou). Postihuje zejména osoby pocházející ze zemí jižní Evropy, odtud plyne i název onemocnění. /7/

S výtažkem byla provedena pilotní studie, která byla dvojitě zaslepená, randomizovaná a samozřejmě kontrolovaná placebem. Studie se účastnily dvě paralelní skupiny, které dohromady čítaly 24 pacientů s dědičnou středozevní horečkou. Výsledek potvrdil výrazné zlepšení u osob, které dostávaly extrakt, oproti kontrolní skupině s placebem. /35/

Další studií, kde ve směsi figuruje i klanopraška čínská, je projekt univerzity Seoul National zabývající se účinkem složeného extraktu pod názvem ESP-102 na CNS. ESP-102 obsahuje výtažky z *Angelica gigas*, *Saururus chinensis* a *Schisandra chinensis*. Pokus byl proveden na myších, kterým byl podáván skopolamin (parasymptolytikum, které má při určitém dávkování negativní účinky na CNS: neklid, excitace, dezorientace, delirium až koma a zástava dechu). Takto „připraveným“ myším byl podáván ESP-102 v dávce od 10 do 100 mg/kg tělesné váhy a od 1 do 10 mg/kg tělesné váhy po dobu deseti dnů. /7, 36/

Výsledky naznačují, že ESP-102 má pravděpodobně protektivní charakter proti odumírání nervových buněk a zhoršujícím se kognitivním schopnostem, které jsou patrné u lidí nemocných Alzheimerovou nemocí, stavech po mrtvicích či po zraněních hlavy a jiných neurodegenerativních nemocích. /36/

3.2. Explantátové kultury

Celou problematiku explantátových kultur zahájil Duhamel de Monceau, který popsal v roce 1756 tvorbu kalusu a pupenů na uměle poraněném kmeni jilmu (*Ulmus*). Téměř o sto let později se obdobnou problematikou podrobněji zabýval Trécul Vochting (1878), který sledoval tvorbu kalusu na izolovaných částech rostliny *Brassica napus*, ale experimenty byly prováděny ještě v nesterilních podmínkách. /37/

V té době z dosavadních poznatků vytvořil souhrnný závěr problematiky Sachs /38/, který vyslovil předpoklad o existenci specifických látek, které stimulují tvorbu rostlinných orgánů. O skutečný začátek v této oblasti se postaral v roce 1902 Haberlandt /39/, který vytvořil základní koncepci explantátových kultur, resp. buněčných kultur na základě studia chování jednotlivých buněk. Jeho kultury odvozené od několika druhů nebyly kontaminovány mikroorganismy, a proto buňky přežívaly i několik týdnů. Zvětšovaly se, dokonce syntetizovaly škrob, ale nebyly schopné dělení. Důvodem bylo, že kultivační médium neobsahovalo látky, které by toto dělení mohly stimulovat. Proto doslova průlomem byly pokusy s kořeny rajčete (*Lycopersicon esculentum*), které provedl White /40/. Pokusy byly provedeny za přítomnosti kvasničného extraktu, který sloužil v kultivačním médiu jako stimulátor růstu, a při přenášení na čerstvé kultivační médium vykazovala kultura stálý růst. Začalo se dařit odvozovat i kalusové kultury, které rostly po určitou dobu na syntetickém médiu (Gautheret 1934) /41/. Pak následoval objev kalusových kultur s neomezeným růstem pod vedením Whitea (1939). White zde použil spontánní tumory vznikající u hybridů tabáku (*Nicotiana glauca*, *N. langsdorfii*), o těchto kulturách je dnes známo, že endogenní obsah rostlinných hormonů stačí k udržení jejich růstu. O pár let později Gautheret a Nobécourt (1939) /42/ pracovali s pletivou mrkve (*Daucus carota*), zde úspěšnost kultivace už zajišťovala přítomnost auxinu v kultivačním médiu. Ve stejné době se podařilo dopěstovat zárodky rodu *Datura* s pomocí kokosového mléka, které přidávali do kultivačního média, a právě zde u kokosového mléka začíná historie těsné souvislosti mezi explantátovými kulturami a růstovými látkami. Výsledky získané při kultivaci habituovaných kultur, tj. kultur, které rostou bez přítomnosti exogenně dodávaných rostlinných hormonů, naznačily, že stimulační látka či látky obsažené v kokosovém mléku nejsou auxinové povahy. Snaha o nalezení konkrétních látek v kokosovém mléku, které mají tento efekt, vedla k objevení cytokininů. O další velmi významný krok v této problematice se zasloužili Skoog a Miller 1957 /43/, kteří určili vliv vzájemného poměru cytokininů a auxinů na regeneraci orgánů v kalusové kultuře tabáku.

Od počátku šedesátých let byla historie explantátových kultur již velmi bohatá a množství poznatků se hromadilo velmi rychle.

Části rostlin izolované za účelem kultivace in vitro se nazývají explantáty. V češtině se ujal pro celou problematiku název explantátové kultury, který do širšího povědomí zavedli Řetovský a Petruš (1956) /44/. Explantátem mohou být spóry, nezralé a zralé zárodky, ale i semena, orgány, pletiva, jednotlivé buňky i buňky zbavené buněčných stěn – protoplasty. Na explantáty nemají vliv jen minerální výživa a přítomné organické látky, tj. kultivační médium, ale i další faktory, které je možno in vitro snadno regulovat, jako jsou světlo (jeho kvalita, intenzita a fotoperioda), teplota a případně i plynná složka kultivačního prostředí, o čemž pojednávám níže.

Základem explantátových kultur je totipotence rostlinné buňky, tj. schopnost plnohodnotné rostlinné buňky dát vznik jakémukoliv pletivu i celému rostlinnému organismu. Od konceptu totipotence, který formuloval Haberlandt (1902) /37/, se odvíjí celá historie explantátových kultur. Nejtypičtěji se tato vlastnost projevuje u zygoty, jež v sobě obsahuje celý organismus, který z ní postupně vzniká. U ostatních buněk je především důležitá jejich plnohodnotnost. Diferenciace nesmí dosáhnout takového stupně, aby byla ztracena nebo ireverzibilně inaktivována část genetické informace, která umožňuje právě vznik jedince ze zygoty. Tuto vlastnost vykazují buňky embryonální a meristematické, s minimálním stupněm diferenciace. Řada typů buněk diferencovaných je rovněž totipotentních. Některé buňky však tuto schopnost ztratily, jako například vodivé buňky v lýku, které neobsahují jádro. U některých typů buněk je zatím nemožné určit, jestli už nejsou totipotentní v důsledku své vysoké diferenciace, či už u nich proběhly ireverzibilní změny, nebo jestli dosud nebyly nalezeny podmínky, které by aktivovaly informaci, jež se nemusí u dané buňky při její specializaci projevovat. K tomuto závěru vedou výsledky pokusů, které ukázaly, že i vysoce specializované buňky pokožky mohou být základem celé rostliny, jak např. ukázali Pheeters a Skirvin (1983) /44/. Jinak řečeno, některé buňky jsou totipotentní, ale dosud není známo, jak tuto jejich vlastnost spustit. Aby diferencovaná, plnohodnotná buňka mohla svoji totipotenci projevit, musí nejprve dojít k její dediferenciaci. To znamená, že se musí vrátit strukturálně i funkčně na úroveň zygoty, buňky embryonální nebo meristematické. Zjednodušují se buněčné orgány a především se obnovuje dělení. /1/

Jak vyplývá z již výše uvedeného, je celá problematika explantátových kultur značně rozsáhlá a štěpí se do menších tematických oblastí. Jednou z možností je

dělení kultur podle kultivovaného explantátu nebo charakteru pletiva. Podle tohoto hlediska rozlišujeme následující kultury:

- kultury izolovaných semen (v různém stadiu vývoje či zralosti)
- kultury izolovaných embryí (v různém stadiu vývoje či zralosti)
- orgánové kultury:
 - a) kultury vegetativních orgánů či jejich částí (kořeny, stonky, listy, meristémy, pupeny)
 - b) kultury generativních orgánů (květní pupeny, poupata, květy, pestíky, tyčinky, prašníky, pylová zrna, spory, gametofyty)
- kalusové kultury
- buněčné kultury
- protoplastové kultury /45/

Je zřejmé, že ani toto dělení explantátových kultur není zcela přesné, hranice mezi jednotlivými kulturami nejsou vždy zcela jasně vymezeny. Například kalusové, buněčné a protoplastové kultury jsou odvozovány od prvních tří uvedených typů kultur, případně jedna od druhé.

Další možné dělení je podle charakteru nově vzniklých struktur, zde rozlišujeme následující:

- organogenezi, kdy se vytvářejí orgány (kořeny, prýt, listové útvary, nebo generativní orgány)
- somatickou embryogenezi, při které vznikají ze somatických buněk embrya víceméně podobná embryím zygotickým. Zvláštním případem je polyembryogeneze, která vzniká tak, že somatická embrya v raném stadiu vývinu se sama dále množí.
- pylovou embryogenezi, nebo androgenezi, při které vznikají zárodky z nezralých pylových zrn

Na explantátové kultury se jistou dobu pohlíželo jako na prostředek zachování genetické stability rostlin prostřednictvím klonování in vitro (klonové množení je způsob, kdy potomstvo vzniká nepohlavní cestou a je genotypově i fenotypově uniformní). Tento názor byl záhy změněn, neboť řada explantátových kultur byla

geneticky nestabilní. U určitých rostlin regenerovaných v kalusových a buněčných kulturách docházelo v průběhu kultivace in vitro ke genetickým změnám na somatických buňkách, které přetrvaly i u rostlin. /46/

Následujícím výzkumem explantátových kultur v průběhu dalších dvaceti let bylo prokázáno, že o genetické stabilitě či nestabilitě rozhoduje průběh morfogeneze. Genetická kontinuita projevující se stabilním diploidním karyotypem je zachována při regeneraci rostlin in vitro z izolovaných vzrostných vrcholů (meristémové kultury), nebo při odvození rostlin ze zygotických embryí v embryonální kultuře. Konstantní genotyp je zachován i v případě regenerace rostlin z adventivních pupenů. Je-li do vývojového cyklu explantátové kultury zahrnuto stadium dediferenciace a neorganizovaného růstu (kalusové, buněčné a protoplastové kultury), je genotyp regenerantů ovlivněn touto cytogeneticky nestabilní fází kultury in vitro. Výsledkem jsou cytogenetické změny a somaklonální variabilita regenerantů. /47/

I tento zdánlivý nedostatek se na základě poznatků z pokračujícího výzkumu podařilo obrátit v pozitivum a využít ve šlechtitelské biotechnologii. Znak selektovaný in vitro se pak přenáší po regeneraci rostlinného organismu sexuální nebo vegetativní cestou na potomstva dalších generací. /47/

Výhodou explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk, a z každé lze opětovně získat novou plnohodnotnou rostlinu, což nás vede k tomu, že lze zakonzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin, ale pouze za předpokladu, že dodržíme zásady při klonování. K dalším přednostem bezesporu patří schopnost růstu na plně definovaných, mnohdy velmi jednoduchých živných půdách. /47/

3.3. Biotransformace

Biotransformace neboli biologická přeměna je přeměna exogenně dodaných látek do explantátové kultury rostlinných buněk na cílené produkty. Tato přeměna se děje např.: oxidací, redukcí, hydroxylací, methylací, demethylací a glykosylací. Některé

z těchto reakcí jako hydroxylace nebo glykosylace mohou mít praktický význam, protože je nelze provést ani chemicky, ani mikrobiologicky. Využití těchto reakcí je však omezeno tím, že explantátové kultury provádějí souběžně několik reakcí, což lze překonat jen přísnou selekcí buněčných linií. /48/

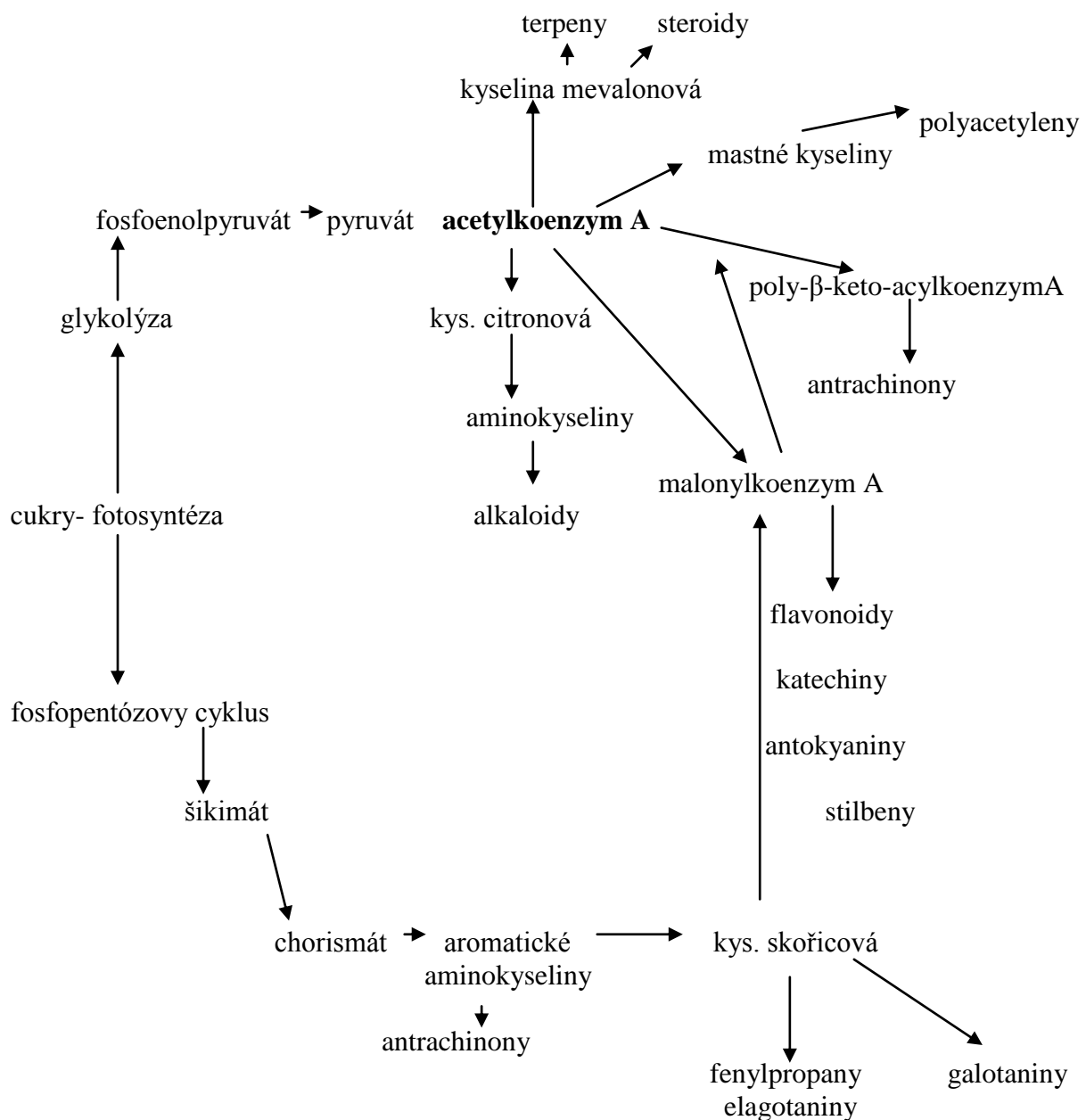
Biotransformace organických látek mikroorganismy jsou známé již dlouho. V rostlinných systémech je získávání žádaných látek zatím nižší. Průmyslovému využití se blíží například hydroxylace β -metyldigitoxinu na β -metyldigoxin buňkami *Digitalis lanata*. S vyšlechtěnými explantátovými kulturami *Digitalis lanata* byla vypracována biotransformace polysyntetického β -metyldigitoxinu až do objemu 200 l živné půdy. /48/

Při využití biotransformace exogenně dodaných látek, lze z poměrně levných a dostupných substrátů získat farmaceuticky významné látky.

3.4. Produkce sekundárních metabolitů kulturami in vitro

Sekundární metabolity

Biogeneze sekundárních metabolitů se v podstatě odvíjí pouze z několika primárních metabolitů: aminokyselin, acetylkoenzymu, mevalonové kyseliny a meziproduktů biosyntézy kyseliny šikimové. /49/



Obr. 5: Biosyntéza sekundárních metabolitů v rostlinách /49/

Sekundární metabolity jsou charakterizovány následujícími znaky:

- Jsou jen v určitých skupinách organismů
- Zpravidla nejsou zdrojem energie, jejich biologická funkce se projeví až na úrovni orgánů nebo organismu
- Tvoří se jen v určitých stádiích ontogenetického vývoje organismu
- Jejich rozklad a syntéza je pomalejší, ukládají se v určitých orgánech. /49/

Sekundární produkty je možné považovat za exkrekty, nebo za produkty detoxikačního mechanismu rostlin, které nemají pro život rostliny zásadní význam. Ale při podrobnějším ohledání je nám zřejmé, že řada sekundárních metabolitů je součástí obranné odpovědi na mikrobiální infekci a „napadení býložravci“, nebo slouží pro přilákání opylujícího hmyzu. /49/

Co se týká výskytu sekundárních metabolitů v rostlině, místa vzniku a ukládání metabolitu nejsou totožná. Tvoří se v určitých pletivech a orgánech, v protoplastech buňky a přemísťují se do určitých kompartmentů, do vakuol nebo buněčných stěn. Při transportu a na místě akumulace se mohou látky chemicky přeměňovat, vlivem odlišných enzymových systémů působících v místech transportu a ukládání. /49/ Transport do jiných pletiv a orgánů se děje pomocí vodivých pletiv. Lipofilní látky se transportují tak, že jsou převedeny na glykosidy, tedy na látky ve vodě rozpustné. U alkaloidů se uplatňuje tvorba rozpustných solí v kyselém pH buněčné šťávy. Silice jako lipofilní exkrekty se tvoří v určitých kompartmentech a ukládají se v lysisenních nebo schizogenních dutinách, nebo pod kutikulou zvedající se puchýřovitě nad stěnou buňky. /50/

Faktory ovlivňující produkci sekundárních metabolitů v kulturách in vitro

Hromadění metabolitů je výsledkem dynamické rovnováhy mezi tvorbou produktu, transportem, uskladněním, přeměnou a degradací. Je ovlivněno mnoha faktory, biochemickými, fyzikálními či chemickými. Mezi tyto faktory patří:

1. fyziologický stav buňky
2. složení média
 - a) růstové látky: auxiny, cytokininy, brassinosteroidy, gibereliny
 - b) zdroj uhlíku
 - c) minerální výživa
3. teplota
4. světelný režim
5. uskladnění a exkrece
6. vzdušnění a míchání /51/

1. Fyziologický stav buňky

K faktorům, které mohou ovlivnit průběh kultivace patří „zdravotní“ stav donorové rostliny, genotyp, orientace explantátu, velikost explantátu, ontogenetické stadium a fyziologický stav rostlin, inokulační hustota, období odběru explantátu a samozřejmě orgán, ze kterého byl explantát izolován. /52/

Průběh kultivace může být značně ovlivněn ještě před izolací explantátu. Toho se dosahuje různými způsoby, především působením na donorové rostliny různými látkami, a to přímo i nepřímo, nebo i prostřednictvím rostlinných hormonů. Výraznou roli hraje i ontogenetické stadium, ve kterém se donorová rostlina nachází v době odběru na explantátovou kulturu. Například u dřevin platí, že juvenilní stadia reagují na kultivaci lépe než stadia dospělá. Rostlinné hormony můžeme uplatnit i při rejuvenilizaci, a tak ovlivnit průběh kultivace in vitro. /49, 53/

2. Složení média

a) Fytohormony

Začátkem minulého století byl růst vysvětlován převážně v souvislosti s procesy výživy. Ale již tehdy vyslovil německý botanik Julius von Sachs (1880, žák Jana Evangelisty Purkyně) /37/ domněnku o existenci chemických signálů, kterými mohou vzájemně komunikovat jednotlivé orgány rostlin. Obecně je nazýváme růstové regulátory, jsou to auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen. Mimo tyto látky existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou, které mezi hormony řazeny nejsou. Fytohormony jsou výrazně méně specifické než hormony živočišné, každý z hormonů ovlivňuje několik často odlišných procesů a naopak, tentýž proces bývá ovlivněn větším počtem různých látek.

Auxiny

Auxin je nejdéle známým rostlinným hormonem, jeho existence byla prokázána ve dvacátých letech minulého století. Prokázalo se, že špičky koleoptilů produkují látku,

kteřá difunduje do agaru a stimuluje prodluřování rostlin – odtud i název auxin (v řečtině „růst“). Auxiny můžeme dělit na nativní a syntetické.

– nativní fytohormony

kyselina indol-3-octová (IAA)

kyselina fenyl-octová (PAA)

kyselina indol-3-máseľná (IBA) /37/

– syntetické

naftalenové kyseliny: nejdůležitější je k. α -naftyl-octová kys. (NAA)

chlorfenoxy kyseliny: k. 2,4-dichlorfenoxy-octová (2,4-D)

k. 2-metyl-4-chlorfenoxy-octová (MCPA)

benzoové kyseliny: 2,3,6- a 2,4,5-trichlorbenzoová, dicamba

deriváty kyseliny pikolinové: picloram /37/

Z fyziologických účinků auxinů v rostlinách je nejlépe prostudována stimulace dlouživého růstu. S růstovou stimulací souvisí i úloha auxinu v regulaci tropismů (gravitropismus, fototropismus). Další z výrazných růstových účinků auxinu je stimulace tvorby adventivních kořenů na segmentech stonků a stejně tak je tomu i u explantátů.

Auxiny bývají do kultivačních médií přidávány většinou v kombinaci s cytokininy. Vzájemná kombinace podporuje jak dediferenciaci, tak opětovnou diferenciaci. Bylo provedeno velké množství pokusů, ve kterých se hledala vhodná kombinace hormonů a jejich správné poměry koncentrací. Problém je v tom, že dochází nejen k interakci exogenně dodávaných látek, ale celá kultivace je ovlivňována i endogenními rostlinnými hormony. Proto měla naprostá většina pokusů značně empirický charakter a i dnes je obtížné tyto poměry koncentrací zobecnit. /37/

Cytokininy

nativní fytohormony:

- izopentenyladenin
- trans-zeatin
- dihydrozeatin
- deriváty N6 –benzyladenin (BA)
- difenylmočovina
- tidiazuron

syntetické fytohormony:

- N6-benzyladenin (BA)
- N6-(m-hydroxybenzyl)adenin
- kinetin (6-furfurylaminopurin) /37/

Objev cytokininů jako samostatné skupiny rostlinných hormonů vyznačujících se stimulačním působením na buněčné dělení vycházel z poznatků Haberlanda (1913) /54/. Na základě poznatků jeho a dalších vědců /55/ byly cytokininy definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu stimulují v některých rostlinných tkáňových kulturách buněčné dělení a vykazují další fyziologické účinky. /56/

První objevený 6-furfurylaminopurin, tedy kinetin byl syntetický. Dlouhou dobu se předpokládalo, že jako endogenní se cytokininy nevyskytují. Ale již v roce 1972 byl popsán výskyt o-hydroxybenzyladeninu v listech topolu. /57/ Protože tato látka má jen velmi nízkou cytokininovou aktivitu, nebyla tomuto objevu věnována taková pozornost, jak by jí náleželo. Dnes je však známo, že benzyladenin a jeho deriváty nesoucí v poloze orto nebo meta benzenového kruhu hydroxylovou skupinu (o-, m-topoliny, neboli obecně aromatické cytokininy) se běžně vyskytují v rostlinách. Nejvyšší aktivitu vykazuje m-topolin (m-hydroxybenzyladenin). /58/

Další přirozený (endogenní) cytokinin byl nalezen v nezralém endospermu kukuřice a byl nazván zlatin. /59/ V současné době známe více než 30 přirozených cytokininů. Strukturně všechny vycházejí z adeninu substituovaného na aminoskupině v poloze 6, tato konfigurace je podmínkou biologické aktivity. Modifikace adeninového skeletu či změna počtu atomů uhlíku v postranním řetězci vede ke značnému snížení až ztrátě biologické aktivity. /60/

Hlavním účinkem cytokininů je stimulace buněčného dělení. Cytokiny působí na fyziologické procesy často v interakci či kooperaci s ostatními fytohormony, zejména s auxinem (McGaw et al. 1988) /61/. Jiné interakce s cytokininem vykazuje ethylen a některé aromatické deriváty močoviny a thiomčoviny. Tímto směrem se ubíralo mnoho prací a výzkumem bylo doloženo, že převažuje-li auxin, na explantátu se převážně vytváří kalus a kořeny. Jsou-li koncentrace obou hormonů vyrovnané, tvoří se pouze kalus, a pokud převažuje cytokinin, vzniká kalus s regenerujícími prýty. /62/ Tímto způsobem je možné dosáhnout až regenerace celé rostliny.

Brassinosteroidy (BR)

První rostlinný steroid s regulačním účinkem byl izolován v r. 1979 z pylu řepky (*Brassica napus*) a byl nazván brassinolid. Následný výzkum prokázal, že brassinosteroidy jsou velmi obsáhlou skupinou látek (dnes je známo více než 30 typů endogenních látek) vyskytujících se v širokém spektru rostlin a ve všech orgánech s výjimkou kořenů, kde jejich výskyt nebyl dosud dostatečně dokumentován. Nejvíce brassinosteroidů obsahují reprodukční orgány, některé byly nalezeny i v houbách a řasách. K nejvíce se vyskytujícím patří brassinolid, castasteron a typhasterol. /1, 63/

Tato skupina látek působí ex vitro na prodlužování stonku a morfogenezi, jejich účinná koncentrace se pohybuje v rozmezí 10^{-8} – 10^{-11} mol/l, je tedy nižší než u auxinu.

Morfogenní účinky brassinosteroidů byly dokázány v kultuře izolovaných mezofylových buněk *Zinnia elegans*, kde jejich přítomnost stimulovala tvorbu tracheálních elementů, ovšem za přítomnosti auxinu a cytokininu (Iwasaki a Shibaoka (1991). /64/ Dá se předpokládat, že brassinosteroidy působí v explantátové kultuře obdobně jako v jiných experimentálních systémech, tj. synergicky s auxinem./65, 66/ To platí pouze v případě, že BR jsou aplikovány první (před IAA). Jsou-li aplikovány následovně, působí spíše inhibičně. /64/ Přitom ale BR neovlivňují ani metabolismus, ani transport IAA. Má se za to, že BR zvyšují citlivost pletiv vůči IAA. /37/

To, že se tyto látky používají při kultivaci explantátů dosud v poměrně malé míře, je způsobeno pravděpodobně tím, že se zatím jedná o novější skupinu regulátorů, a nesporně také proto, že mají horší komerční dostupnost, a v neposlední řadě je i jejich špatná rozpustnost ve vodě. /37/

Gibereliny

Gibereliny byly v rostlinách objeveny v 50. letech v extraktu houby *Gibberella fujikuroi* byla identifikovaná účinná látka kyselina giberelová. Dnes je známo asi 90 různých molekul s giberelinovou strukturou.

Podobně jako auxiny i gibereliny významně stimulují dlouhivý růst. Na rozdíl od auxinů se tento účinek týká pouze nadzemních částí rostlin, růst kořenů není gibereliny obvykle ovlivněn.

Dalšími účinky giberelinů jsou stimulace buněčného dělení, indukce kvetení u dlouhodobých rostlin, urychlení nasazení plodů a jejich růst atd. /37/

b) Zdroj uhlíku

Jako zdroje uhlíku se používají z monosacharidů a oligosacharidů sacharóza, glukóza, dále řepná a třtinová melasa, z polysacharidů škrob. Škrob nelze přímo použít jako zdroj uhlíku v živných půdách, ale až po zmazovatění, tj. přidáním dostatečného množství vody a zahřátím na 100 °C. /49/

Perspektivním zdrojem by mohla být celulóza, protože čistý výtěžek fotosyntézy činí ročně na Zemi 15 až 20 × 10¹⁰ tun organické hmoty, z čehož polovinu tvoří celulóza. K tomu je ale potřeba vypracovat levný způsob její hydrolýzy na glukózu.

c) Minerální výživa

Při kultivaci rostlin, orgánů, pletiv i buněk v systémech in vitro byla zatím největší pozornost pochopitelně věnována účinkům fytohormonů, sacharidů, teploty, vlhkosti. Téměř bez povšimnutí zůstávají problémy spojené s příjmem a utilizací minerálních živin, protože obsah jednotlivých minerálních živin v kultivačních médiích byl stanoven v podstatě jen empiricky. Nejznámější a nejčastěji používané médium Murashigeho-Skooga /67/ bylo sice připraveno na základě analýz obsahu minerálních látek v biomase kalusu, avšak přes úsilí o nalezení optimálních dávek živin nelze tento postup označit jako fyziologicky správný. /1/

3. Teplota

Teplotní optimum pro růst explantátu se uvádí cca 23–29 °C. Určité rostlinné druhy však mohou preferovat jiné teplotní rozmezí. /68/

Teplota ovlivňuje explantátovou kulturu modifikováním biochemických a fyziologických procesů. Například snížením kultivační teploty lze v buňkách docílit nárůstu mastných kyselin. To se samozřejmě týká i metabolismu růstových regulátorů. Například Paquereau-Trapy a Guern (1983) /69/ zjistili u buněčné kultury javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*), že pro dělení buněk je nutná vyšší koncentrace 2,4-D při nižší teplotě 16 °C než při teplotě 25 °C. /37/

4. Světelný režim

Viditelné záření (400–750 nm) je nejdůležitějším faktorem prostředí ovlivňujícím růst a vývoj rostlin. Rostliny však reagují pouze na záření určitých vlnových délek, tzv. akčních spekter. Neaktivnější oblastí spektra záření, která nejvíce ovlivní růst a vývoj rostlin, je oblast červeného záření, zejména vlnové délky 660–730 nm, a záření modré s absorpčními maximy 370, 450 a 480 nm. Růstově aktivní je i oblast UV-B 280–320 nm. /1/

Při studiu světelných podmínek kultivace se dospělo k různým výsledkům a to jak z hlediska růstu kultur, tak i z hlediska akumulace metabolitů. /70/

Byly např. srovnávány následující varianty světelných podmínek: stálé zatmění, pravidelné střídání denní světelné periody, stálé osvětlení zářivkou 4000 lx a stálé osvětlení sodíkovou výbojkou 9500 lx. Růst kultury se stoupající intenzitou světla snižoval. Nejvyšší přírůstky čerstvé hmotnosti kultury byly zaznamenány při kultivaci ve tmě. Světlo však stimulovalo regeneraci rostlin. Sodíková výbojka měla oproti zářivce nepatrný, statisticky nevýznamný pozitivní vliv na proliferaci. /70/

Obdobné výsledky vykazovala kultura *Petroselinum hortense*. /71/ Při kultivaci za tmy došlo ke zvýšené proliferaci, ale nebyly tvořeny flavonoidy. Ke zvýšené tvorbě těchto glykosidů docházelo při kultivaci za světla. Stejně tak u suspenzní kultury *Impatiens balsamina*. /72/ Při kultivaci za tmy došlo k potlačení biosyntézy sekundárních metabolitů (flavonoidů) a naopak pozitivní vliv na tvorbu těchto metabolitů mělo UF světlo. /70/

5. Uskladnění a exkrece

V biosynteticky aktivních buněčných kulturách jsou sekundární metabolity přítomny ve vakuolách, nebo vyloučeny do růstového média. V prvním případě nastává problém s uvolněním metabolitů z vakuol do média, aniž by došlo k usmrcení buněk. Ve druhém případě je izolace sloučenin celkem jednoduchá.

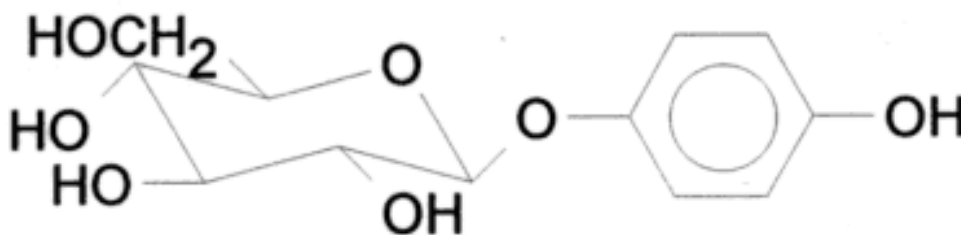
Vyvstává zde další problém, totiž degradace způsobená lytickými vlastnostmi růstového média. V extracelulárním kompartmentu jsou přítomny oxidační enzymy, které jsou pravděpodobně zodpovědné za vymizení sekundárních metabolitů z média. Mimo zmíněné oxidázy se zde nacházejí hydrolázy, lipázy, glukosidázy, fosfatázy, proteinázy a nukleázy. Tyto látky jsou součástí lytického kompartmentu vakuol a jsou vylučovány do média jako výsledek funkčních a metabolických vztahů mezi vakuolami a extracelulárním médiem.

Výsledným řešením se ukázaly „dvoufázové kultury, kde vyloučené sekundární metabolity jsou zachytávány ve druhé fázi, například pomocí iontoměničů, nebo aktivního uhlí.“ /73/

6. Vzdušnění a míchání

Správné vzdušnění a míchání živných pūd je jedním z hlavních faktorů zaručujících úspěch u suspenzních kultur. Přestup kyslíku z plynné fáze do kapaliny se děje molekulární difuzí. Tzv. dvoufilmová teorie předpokládá tvorbu plynného a kapalinového filmu na fázovém rozhraní plyn–kapalina, kdy veškerý odpor při transportu kyslíku z plynné do kapalně fáze je soustředěn na straně kapaliny, tj. kapalinový film. Kyslík se rozpouští v kapalině buď povrchově ve stacionární kultuře, nebo submerzně v baňkách na třepacích strojích, nebo v bioreatorech, které mají přívod vzduchu a míchadlo. Míchání může být rozděleno podle způsobu dodávání energie na mechanické, pneumatické a hydraulické. /49/

3.5. Arbutin – terapeutické využití, biosyntéza



Obr. 6: ARBUTIN (hydrochinon- β -D-glukopyranosid):

Arbutin patří do velké skupiny glykosidů. Glykosidy obsahují vždy cukernou složku vázanou glykosidicky (poloacetalovým hydroxylem) na necukernou (aglykon), v případě arbutinu se jedná o jednoduché fenoly./74, 75/

Arbutin (hydrochinon- β -D-glukopyranosid) je sekundární metabolit v řadě vyšších rostlin. Obvykle se vyskytuje v následujících čeledích: *Rosaceae*, *Saxifragaceae*, *Rubiaceae*, *Fabaceae* a v řádu *Ericales*.

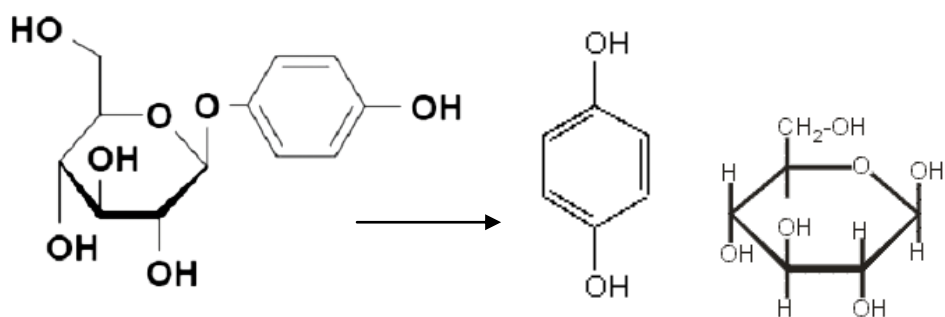
Jedním z hlavních zdrojů arbutinu, a to až 11 %, a methyларbutinu je medvědice léčivá (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.)) z čeledi *Ericaceae*.

Medvědice léčivá je nízký, vždyzelený keřík s listy střídavými, kožovitými. Roste ve vyšších polohách na písčitých nebo kamenitých půdách, ve světlých borových lesích, v mírných a studených pásmech Evropy a Severní Ameriky. U nás je medvědice vzácná, a tudíž i chráněná. Sbírají se listy *Uvae ursi folium*. /76/

Terapeutické využití

Extrakt z listů medvědice léčivé je používán pro své antimikrobiální účinky na infekce močových cest. Nejpoužívanější lékovou formou je *Species urologicae Planta*. I přes celkem široké používání se donedávna nevědělo o přesné efektivní koncentraci arbutinu pro p. o. léčbu. Danou problematikou se zabýval Frohne /77/, který potvrdil účinek drogy *Uvae-ursi folium* a uvedl, že koncentrace arbutinu by měla být vyšší než 0,3 % /77, 78/.

Je známo, že po perorálním podání arbutinu zdravým pokusným krysám dochází k jeho vylučování močí v nezměněné formě, a to i nezávisle na hodnotě pH moči. /79, 80/. Na základě těchto poznatků byl vysloven předpoklad o autocidním působení patogenních bakterií, které svou extracelulární β -glukosidázovou aktivitou štěpí v močových cestách antimikrobiálně neúčinný arbutin v účinný hydrochinon – viz obr.



Hydrochinon- β -D-glukopyranosid \longrightarrow hydrochinon + glukóza

Obr. 7: Při působení β -glukosidázy, dochází k rozkladu arbutinu

Podmínkou pozitivního terapeutického efektu by pak bylo, aby agens představoval mikroorganismus s extracelulární β -glukosidázovou aktivitou. V pokusech /78/ byla zjištěna největší β -glukosidázová aktivita u následujících patogenních bakterií, které způsobují patogenní procesy v močových cestách: *Streptococcus faecalis* 100 %, rodu *Klebsiella* 95 %, rodu *Enterobacter* 72 %, menší u rodů *Proteus-Providencia* 37,1 %, *Proteus vulgaris* 50 % a nejnižší u *Escherichia coli* 11,6 %. /78/

K testování účinné koncentrace p.o. podávaného arbutinu byla použita následující koncentrační řada arbutinu: 0,08; 0,16; 0,24; 0,32; 0,4; 0,56; 0,8 %.

Výsledky kultivací ukázaly inhibici růstu (90–100 % baktericidního účinku) již zmíněných mikrobů v následujících koncentracích arbutinu.

<u>Mikrobiální druh</u>	<u>koncentrace arbutinu v %</u>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,4 %
<i>Streptococcus faecalis</i>	0,4 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,56 %
<i>Proteus vulgaris</i>	0,56 %
<i>Proteus mirabilis</i>	0,56 až 0,8 %

/78/

Při testování účinků vodného extraktu medvědice léčivé byly zvoleny dvě mezní koncentrace arbutinu (0,24; 0,56 %) v celkové směsi obsahových látek extrahovaných z listů (třísloviny, flavonoidy, iridoidy). Výsledkem bylo, že extrakt s obsahem 0,24 % arbutinu v médiu vykazoval jeho štěpení na hydrochinon, avšak antimikrobiální účinek nebyl prokázán. Extrakt s obsahem 0,56 % arbutinu v médiu naopak nevykazoval žádné štěpení (stanovení v inkubované směsi potvrdilo nezměněný obsah arbutinu), přesto byla jednoznačně prokázána nižší růstová aktivita bakterií oproti kontrole, která se ještě snižovala délkou inkubace (48 hodin). Růst *Escherichia coli* byl i tady ovlivněn neprůkazně. /78/

Dosavadní výsledky ukazují, že používaná léková forma *Species urologicae Planta* by se měla změnit v receptuře, tak i v dávkování, protože při současném dávkování drogy nemůže být dosaženo optimálních koncentrací účinné látky. /78/

Medvědice léčivá je účinná nejen na již zmíněné choroby močových cest, ale i na terapii kašle a při léčbě chronické bronchitidy. Tento fakt byl stimulem pro pozorování antitusivního efektu arbutinu za experimentálních podmínek. Výsledek potvrdil antitusivní účinek, a to v dávkách od 50 do 100 mg/kg b. w. p. o. po mechanickém podráždění dýchacích cest u pokusných koček. U zvířat došlo ke snížení ataků kašle, frekvence a úsilí při kašli. Zvýšení dávky nad 100 mg/kg b. w. už není vhodné, neboť při tomto dávkování už nedojde k vyššímu antitusivnímu efektu. /81/

Tento účinek arbutinu je velmi blízký účinku kodeinu (dávkování dospělí 15–30 mg 3× denně)./88/ Ve srovnání s dropropizinem (dávkování dospělí 20 mg 6–8× denně) je efekt arbutinu silnější. /81, 82/

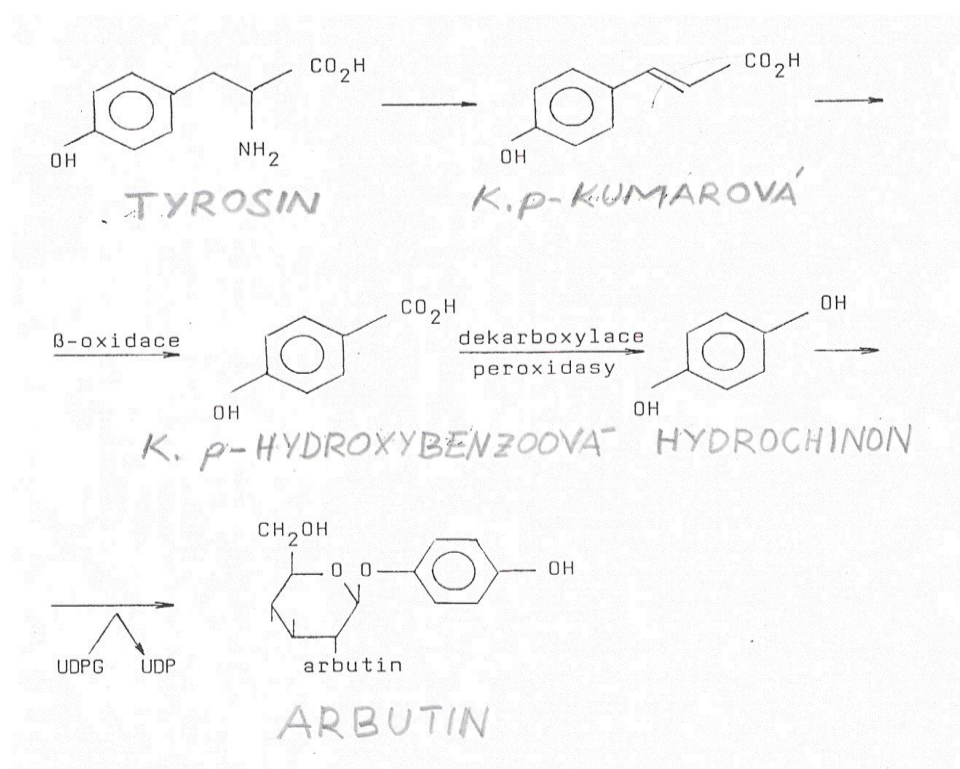
Další využití arbutinu je v kosmetice a dermatologii, zde se používá ke snížení tvorby melaninu (pigment, který je obsažen v kůži, vlasech, duhovce oka; výchozí látkou k syntéze melaninu je tyrosin) v melanocytech. /83/

Problematikou ovlivnění produkce melaninu v melanocytech se zabývali v Číně na Univerzitě Xian Jiao Tong. Zde zkoumali účinek směsi arbutinu a aloesinu. Výsledky studie ukázaly na inhibici tyrosinové aktivity lidských melanocytů a výraznou redukcí

v obsahu melaninu. Aloesin a arbutin byly zkoušeny i jednotlivě a na rozdíl od směsi nevykazovaly takových výsledků. /84/

Biosyntéza

Arbutin je syntetizován vyššími rostlinami z tyrosinu přes kyselinu p-kumarovou a p-hydroxybenzoovou, která přechází oxidativní dekarboxylací a glukosylací na arbutin.



Obr.8: Schéma biosyntesy arbutinu

Biotechnologická produkce arbutinu

Přestože je arbutin komerčně dostupný chemickou syntézou, jsou hledány alternativní zdroje a možnosti jeho získávání a to s použitím rostlinných explantátových kultur.

Na katedře farmaceutické botaniky a ekologie byla provedena celá řada pokusů. Bylo zjištěno, že kultura *Arctostaphylos uva-ursi* arbutin neprodukuje, což je přisuzováno chybějící arbutoidní endomykorhize, která je známá u intaktní rostliny, ale u sterilně pěstované tkáňové kultury chybí. /85/ Proto byly další pokusy zaměřeny na testování biotransformačních schopností kultur různých rostlin s využitím exogenně dodaných prekurzorů arbutinu.

Biotransformační schopnost glukosylovat exogenně přidaný hydrochinon byla zjištěna u celé řady kultur *Datura meteloides*, *Datura innoxia*, *Rhodiola rosea*, *Rheum palmatum*, *Leuzea carthamoides*, *Leonurus cardiaca*, *Coronilla varia*, *Brassica oleracea*, *Bergenia crassifolia*, *Bellis perennis*, *Rauwolfia serpentina*, *Catharanthus roseus*. /86, 87, 88/

V případě kultur *Datura meteloides* a *Schisandra chinensis* byla produkce transformovaného arbutinu 5 až 8%, což odpovídalo obsahu v intaktní rostlině medvědice léčivé. /88/

4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje

Laboratorní analytické váhy, AND HELAGO, s. r. o.

Přesné váhy, KERN 572

Horkovzdušný sterilizátor, CHIRANA IP 21

Box s laminárním prouděním, Holten Lamin Air (HV MINI)

Sušárna CHIRANA

UV/VIS detektor PU 4110 Philips

Multichannel detektor DAD PU 4021 Philips

Pumpa PU 4110 Philips

Předkolona 30 × 3 mm CGC SGX C₁₈, velikost částic 10 μm (TESSEK Praha)

Kolona 250 × 4 mm PUROSPHER-STAR RP – 18 endcapped, velikost částic 5 μm (Merck, Darmstadt)

Sušárna Memmert

Silufol[®] UV 254 sklárny KAVALIER, závod Votice

TLC hliníkové folie silikagel 60, Merck

Kolona 250 × 4 mm PUROSPHER RP – 18 endcapped, velikost částic 5 μm (Merck, Darmstadt)

4.2. Použité chemikálie

Agar, Dufco Labororiem

Amoniak, vodný roztok min 25 % p. a., Lachema

4-aminoantipyrin čistý, Chemapol

Arbutin pro laboratorní účely, Roth

Ethanol 96 %

Glycin p. a., Lachema

Hexakvanoželezitan draselný p. a., Lachema

Hydrochinon p. a., Lachema

Chloroform p. a., Lachema

Chlorid železitý čistý, Reachim

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová pro biochemické účely, Merck

Kyselina fosforečná p. a., Lachema

Kyselina chlorovodíková, Lachema
Kyselina nikotinová čistá, Lachema
Methanol gradient grade for liquid chromatography
Methanol p. a., Lachema
Methylarbutin izolovaný na katedře
Pyridoxin hydrochlorid DAB 6, Loba Chemie
Thiamin Hydrochlorid B.P.,U.S.P., Koch-Light Laboratoriem Ltd.

4.3. Použitý biologický materiál a založení kultury

K pokusům byla použita *Schisandra chinensis*. Intaktní rostlina byla získána ze zahrady léčivých rostlin Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Postup sterilizace:

1. aqua purificata (10 min)
2. 70% ethanol (3 min)
3. aqua purificata (10 min)
4. 10% chlorové vápno (20 min)
5. aqua purificata (10 min)
6. 10% Savo (20 min)
7. aqua purificata (10 min)

Pro založení tkáňové kultury byly za aseptických podmínek (v laminárním boxu) odebrány květní pupeny. Explantáty *Schisandra chinensis* byly kultivovány na živné půdě podle Murashigeho a Skooga /67/ s přídavkem 2,4 D v koncentraci 0,1mg/l.

4.4. Biotransformační pokusy

Pro biotransformační pokusy byly kalusové kultury převedeny na můstky z filtračního papíru v tekutém živném médiu MS s přídavkem 2,4 D v koncentraci 0,1mg/l. Po třech týdnech kultivace byly do živné půdy přidávány sterilně prekurzory. Pokusy probíhaly v pasážích 46 až 49.

Použité prekurzory: kyselina 4-hydroxybenzoová (PHB) 200 mg/l

H 100 mg/l, 200 mg/l

Doby působení prekurzorů: PHB - 6, 12, 24, 48, 168 hodin

H - 2, 3, 4, 5, 6, 8 dnů

4.5. Analýza obsahových látek

Příprava extraktu:

Kalusy byly sušeny při pokojové teplotě na skleněných Petriho miskách, rozetřeny v třecí misce a navážka 0,250 g byla extrahována v 5 ml ethanolu 96 % za studena po dobu 48 hodin. Extrakt byl následně zfiltrován a částečně odpařen.

Charakteristika TLC systému

Analýza byla provedena na deskách, Silufol^R UV 254 sklárny KAVALIER, závod Votice a TLC hliníkové folie silikagel 60, Merk.

Vyvíjecí soustava: Chloroform a Methanol v poměru 75 : 25

Standardy: 0,1% metanolicke roztoky – arbutin A

– methylarbutin MA

– hydrochinon H

– 4-methoxyfenol PMF

Detekce: Postupný postřik následujícími detekčními činidly:

- postřik 1M roztokem kyseliny chlorovodíkové, po němž následovalo sušení v horkovzdušné sušárně při teplotě 105 °C po dobu 10–15 min.
- postřik 20% vodným roztokem amoniaku, po kterém jsme desku Silufolu^R sušili při laboratorní teplotě
- postupný postřik : 4-aminoantipyrin 0,02 M vodný roztok
20% vodným roztokem amoniaku
1% vodným roztokem K₃Fe(CN)₆

Charakteristika HPLC systému

Pumpa: PU 4100 Philips

Detektor: PU 4110 UV/VIS Philips

Kolona: Purospher-star, RP-18 endcapped, 5 µm, 250 × 4 mm, Merk

Předkolona: Tessek, SGX C18, 10µm, CGC 3x30mm

Vlnová délka: 285 nm

Průtok: 1,5 ml/min

Nanášený objem: 20 µl

Fáze: gradient 5%MeOH / 95%H₂O za 15 minut 95%MeOH / 5% H₂O

Kalibrační závislosti standardů

Na základě šesti HPLC analýz každé koncentrační úrovně jednotlivých vzorků byly pomocí počítačového programu CSV® v. 1,7 firmy Data Apex vypočteny parametry regresní rovnice a sestrojeny kalibrační křivky všech standardů. Obecný tvar regresní rovnice /89/:

$$Y = K \times X + Q$$

X...koncentrace látky (µg/ml)

Y...plocha píku standardu (mV.s)

K...směrnice přímky

Q...absolutní člen

5. Výsledky

Seznam zkratek použitých v tabulkách

A	arbutin
MA	methyларbutin
PMF	4-methoxyfenol
H	hydrochinon
PHB	4-hydroxybenzoová kyselina
+	sledovaná látka prokázána v půdě
-	sledovaná látka neprokázána v půdě
x	neznámá látka

5.1. Výsledky TLC analýzy

Tab.1. Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru PHB v koncentraci 200 mg/l

doba odběru (hod)	sledované látky			
	A	H	MA	PMF
6	-	-	-	-
12	-	-	-	-
24	-	-	-	-
48	-	+	-	-
168	-	-	-	-

Tab.2. Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l

doba odběru (dny)	sledované látky			
	A	H	MA	PMF
2	-	+	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	+	-	-
6	-	-	-	-
8	-	+	-	-

Tab.3. Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l

doba odběru (dny)	sledované látky			
	A	H	MA	PMF
2	-	+	-	-
3	-	+	-	-
4	-	+	-	-
5	-	+	-	-
6	-	+	-	-
8	-	+	-	-

Tab.4. Výsledky TLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru PHB v koncentraci 200 mg/l

doba odběru (hod)	sledované látky			
	A	H	MA	PMF
6	-	+	-	-
12	-	-	-	-
24	-	-	-	-
48	+	-	-	-
168	+	-	-	-

Tab.5. Výsledky TLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l

doba odběru (dny)	sledované látky			
	A	H	MA	PMF
2	+	-	-	-
3	+	-	-	-
4	-	-	-	-
5	+	-	-	-
6	-	-	-	-
8	+	-	-	-

Tab.6. Výsledky TLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l

doba odběru (dny)	sledované látky			
	A	H	MA	PMF
2	+	-	-	-
3	+	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
8	+	-	-	-

Tab.7. Výsledky TLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru PHB v koncentraci 200 mg/l

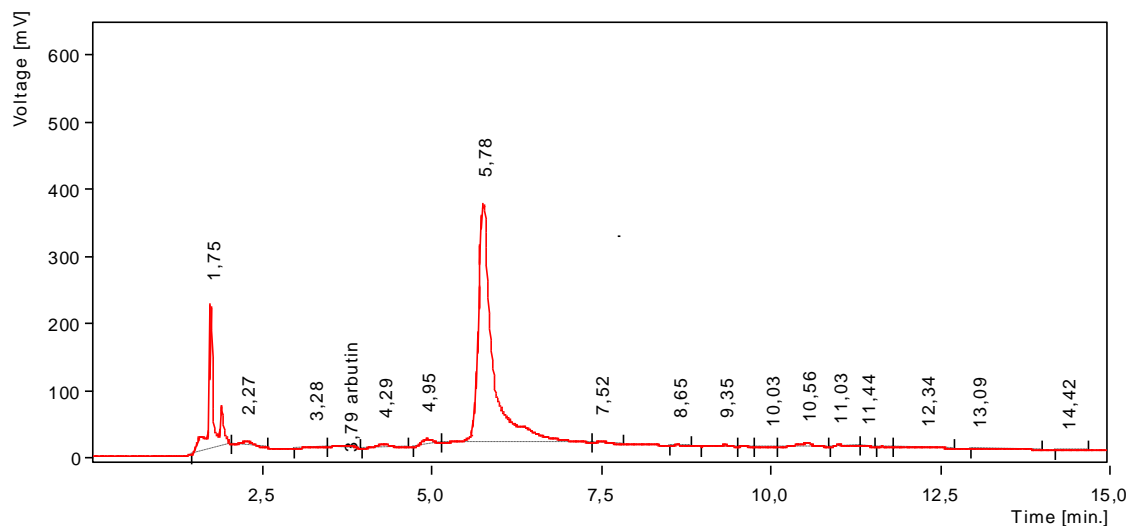
doba odběru (hod.)	neznámá látka
6	-
12	-
24	-
48	x
168	-

Tab.8. Výsledky TLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l

doba odběru (dny)	neznámá látka
2	x
3	-
4	-
5	-
6	x
8	-

5.2. Výsledky HPLC analýzy

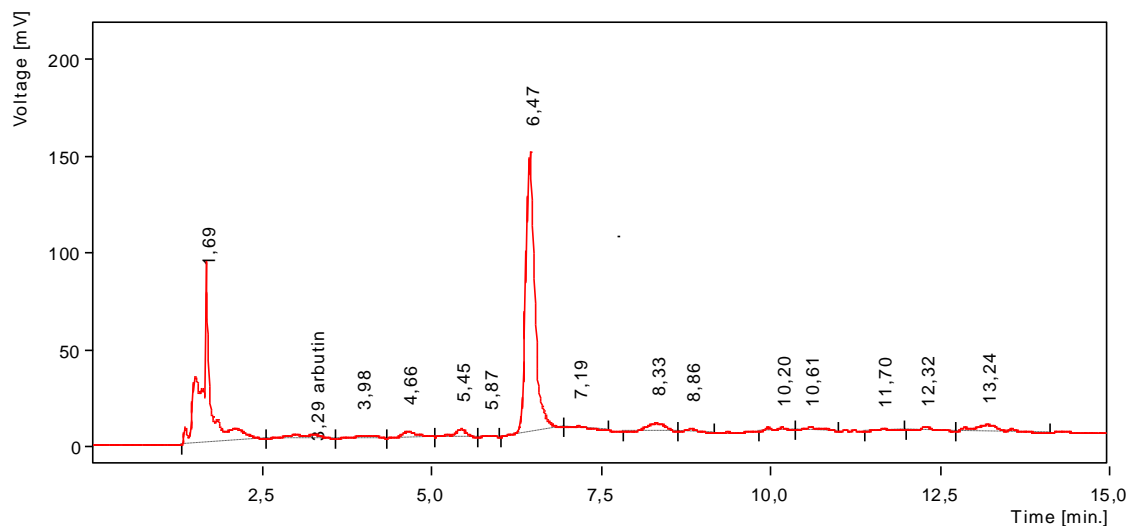
Obr.9: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru PHB v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 48 hodin



Tab.9. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru PHB v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 48 hodin

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Area [%]	Component Name
1	1,75	1235,065	0	0			
2	2,27	91,3365	0	0			
3	3,28	27,1211	0	0			
4	3,79	78,1496	9,90E-02	2,189	Ordnr	1,055	arbutin
5	4,29	100,3771	0	0			
6	4,95	112,5579	0	0			
7	5,78	5480,102	0	0		73,950	neznámá látka
8	7,52	29,0341	0	0			
9	8,65	20,3252	0	0			
10	9,35	36,7196	0	0			
11	9,64	5,4795	0	0			
12	10,03	2,928	0	0			
13	10,56	84,1615	0	0			
14	11,03	28,4982	0	0			
15	11,44	7,6554	0	0			
16	11,68	7,9739	0	0			
17	12,34	35,2039	0	0			
18	13,09	23,4318	0	0			
19	14,42	4,4324	0	0			
-	Total	7410,553	4,5045	2,189			

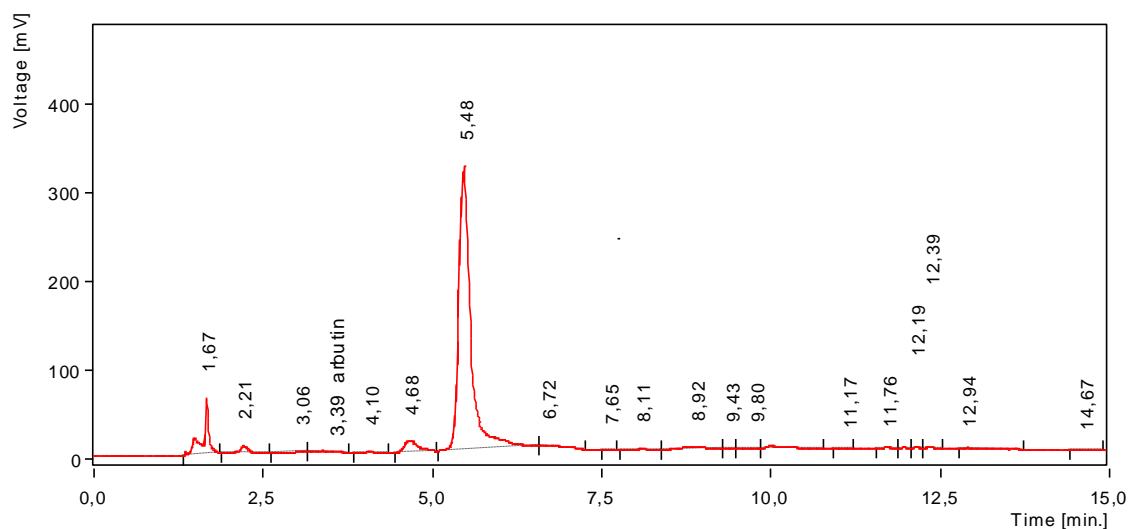
Obr.10: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru PHB v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 168 hodin



Tab.10. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru PHB v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 168 hodin

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Area [%]	Component Name
1	1,69	896,4167	0	0			
2	3,29	69,1967	5,50E-02	1,939	Ordnr	2,416	arbutin
3	3,98	29,2568	0	0			
4	4,66	48,7722	0	0			
5	5,45	49,915	0	0			
6	5,87	6,7613	0	0			
7	6,47	1408,013	0	0		49,206	neznámá látka
8	7,19	24,3521	0	0			
9	8,33	85,8917	0	0			
10	8,86	22,4586	0	0			
11	10,2	29,3307	0	0			
12	10,61	35,5258	0	0			
13	11,7	14,5744	0	0			
14	12,32	25,0703	0	0			
15	13,24	115,9425	0	0			
-	Total	2861,478	2,8409	1,939			

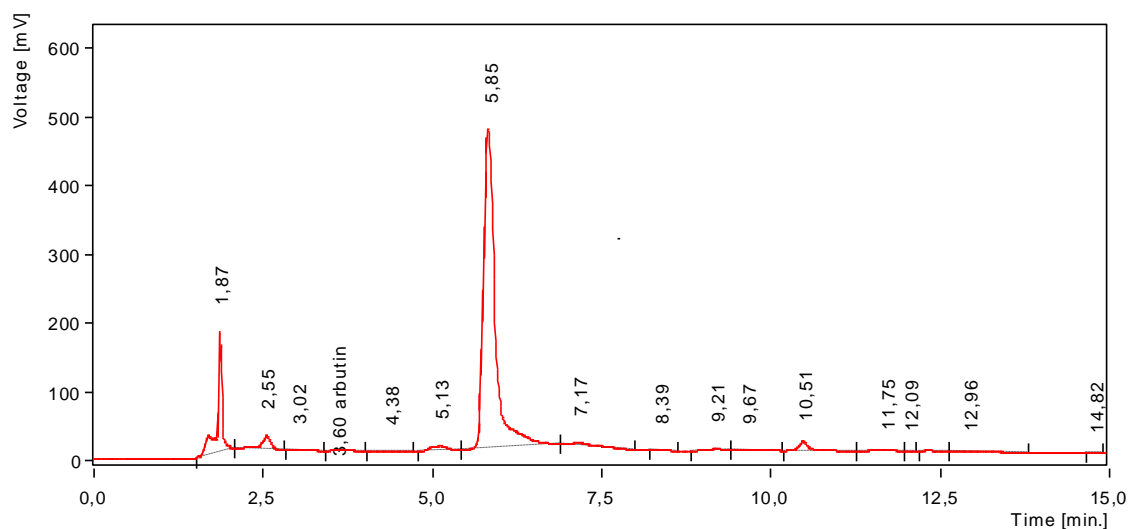
Obr.11: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l, interval odběru 2. den



Tab.11. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l, doba odběru 2 dny

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Area [%]	Component Name
1	1,67	396,5495	0	0			
2	2,21	72,5496	0	0			
3	3,06	9,5296	0	0			
4	3,39	43,5332	4,50E-02	1,22	Ordnr	0,878	arbutin
5	4,1	16,4827	0	0			
6	4,68	183,5792	0	0			
7	5,48	3998,652	0	0		80,676	neznámá látka
8	6,72	43,8714	0	0			
9	7,65	2,4426	0	0			
10	8,11	14,9782	0	0			
11	8,92	60,3452	0	0			
12	9,43	1,8587	0	0			
13	9,8	5,291	0	0			
14	10,03	51,7857	0	0			
15	11,17	2,8412	0	0			
16	11,76	8,0385	0	0			
17	12	3,5362	0	0			
18	12,19	2,1813	0	0			
19	12,39	6,2339	0	0			
20	12,94	25,6369	0	0			
21	14,67	6,5362	0	0			
-	Total	4956,453	3,7037	1,22			

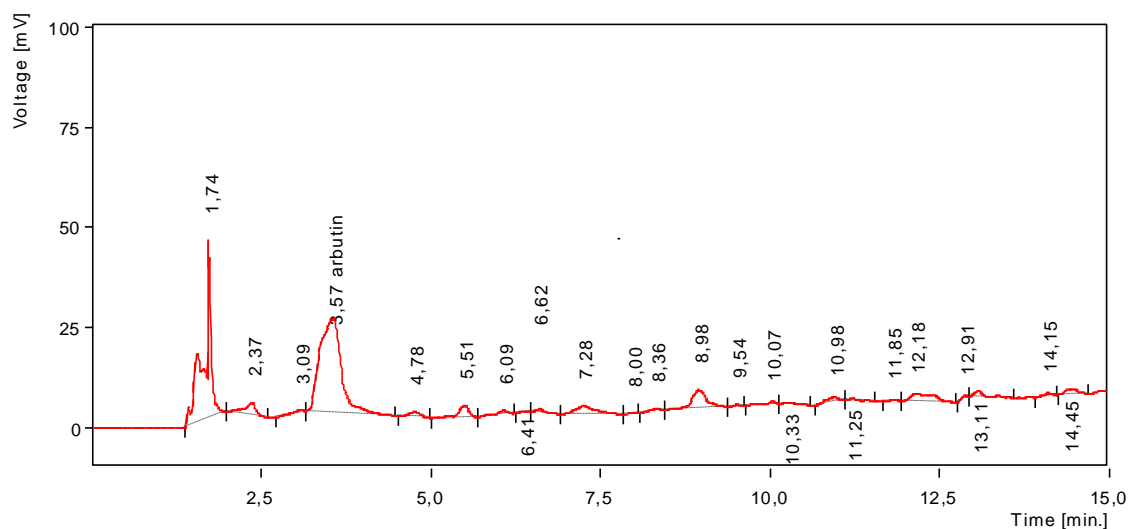
Obr.12: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l, interval odběru 3. den



Tab.12. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l, doba odběru 3. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Area [%]	Component Name
1	1,87	849,7589	0	0			
2	2,55	231,3362	0	0			
3	3,02	16,7606	0	0			
4	3,6	48,6315	2,20E-02	1,362	Ordnr	0,655	arbutin
5	4,38	22,4321	0	0			
6	5,13	135,5178	0	0			
7	5,85	5688,76	0	0		76,627	neznámá látka
8	7,17	140,475	0	0			
9	8,39	7,2078	0	0			
10	9,21	31,249	0	0			
11	9,67	21,2517	0	0			
12	10,51	151,2315	0	0			
13	11,75	30,4916	0	0			
14	12,09	2,5887	0	0			
15	12,35	13,9223	0	0			
16	12,96	26,7581	0	0			
17	14,82	5,5676	0	0			
-	Total	7423,941	1,5847	1,362			

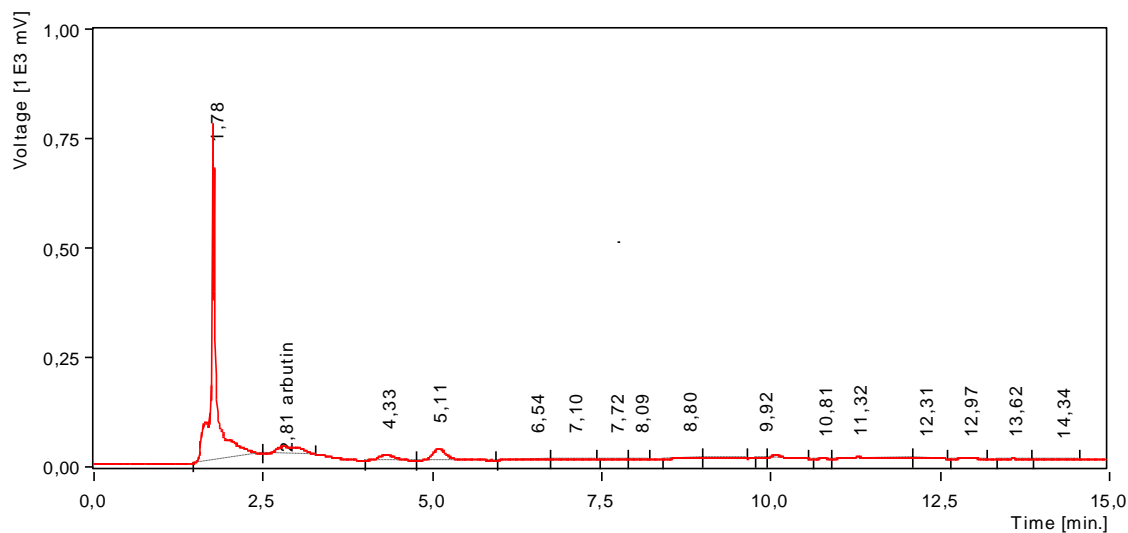
Obr.13: Chromatogram extraktů kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l, interval odběru 5. den



Tab.13. Výsledky HPLC analýzy extraktů kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 100 mg/l, doba odběru 5. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,74	335,6118	0	0		
2	2,37	42,3098	0	0		
3	3,09	6,9859	0	0		
4	3,57	516,1985	0,4853	14,461	Ordnr	arbutin
5	4,78	14,9206	0	0		
6	5,51	32,6777	0	0		
7	6,09	13,5913	0	0		
8	6,41	3,9191	0	0		
9	6,62	9,0113	0	0		
10	7,28	43,6208	0	0		
11	8	1,6242	0	0		
12	8,36	6,8822	0	0		
13	8,98	75,5596	0	0		
14	9,54	2,6827	0	0		
15	10,07	8,906	0	0		
16	10,33	9,0591	0	0		
17	10,98	17,4382	0	0		
18	11,25	4,952	0	0		
19	11,85	3,1147	0	0		
20	12,18	48,653	0	0		
21	12,91	3,9812	0	0		
22	13,11	18,6845	0	0		
23	14,15	5,306	0	0		
24	14,45	16,9384	0	0		
-	Total	1242,629	3,3557	14,461		

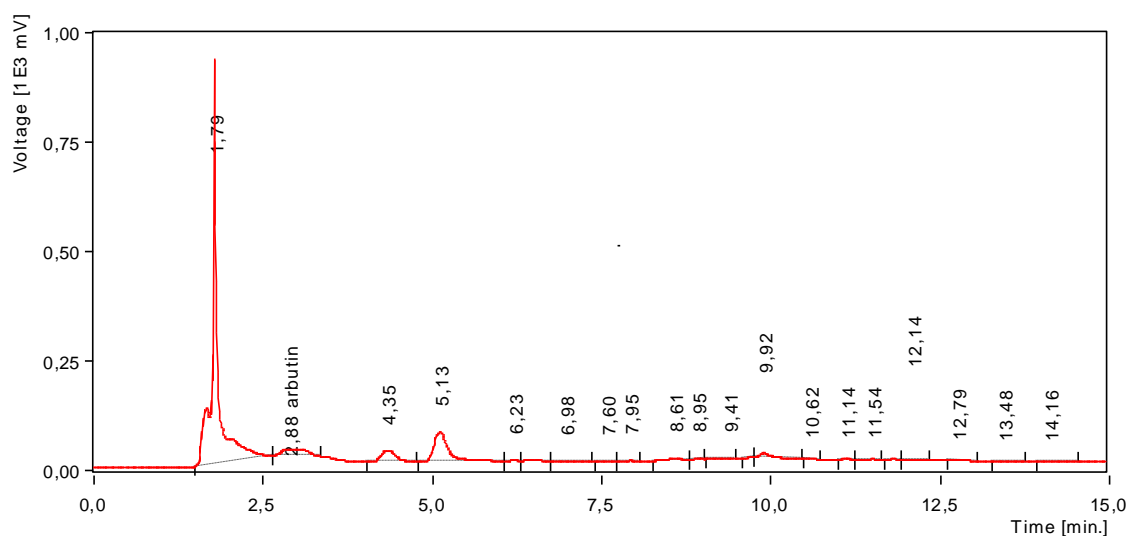
Obr.14: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekurzoru H v koncentraci 100 mg/l, interval odběru 8. den



Tab.14. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekurzoru H v koncentraci 100 mg/l, doba odběru 8. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,78	4108,134	0	0		
2	3,81	426,3865	0,4022	11,945	Ordnr	arbutin
3	4,33	207,2067	0	0		
4	5,11	399,0488	0	0		
5	6,54	38,3046	0	0		
6	7,1	28,1363	0	0		
7	7,72	11,4968	0	0		
8	8,09	7,216	0	0		
9	8,8	50,7549	0	0		
10	9,12	9,8922	0	0		
11	9,92	6,3956	0	0		
12	10,1	63,5495	0	0		
13	10,81	4,9583	0	0		
14	11,32	90,883	0	0		
15	12,31	16,1884	0	0		
16	12,97	24,9243	0	0		
17	13,62	11,9135	0	0		
18	14,34	13,3157	0	0		
-	Total	5518,705	3,367	11,945		

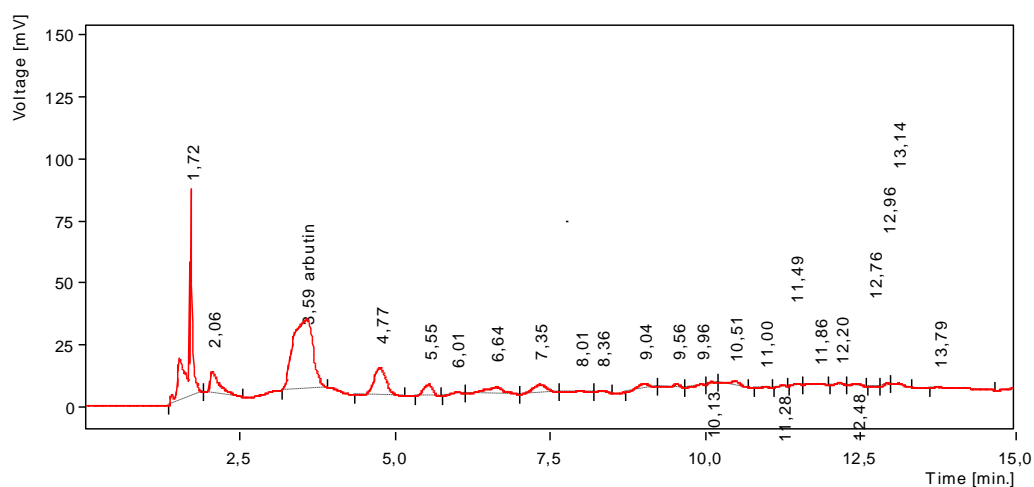
Obr.15: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 2. den



Tab.15. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 2. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,79	5237,586	0	0		
2	3,88	400,4576	0,4021	11,219	Ordnr	arbutin
3	4,35	398,4166	0	0		
4	5,13	997,3915	0	0		
5	6,23	5,1191	0	0		
6	6,51	26,1879	0	0		
7	6,98	24,1799	0	0		
8	7,6	9,7783	0	0		
9	7,95	9,4087	0	0		
10	8,61	53,3231	0	0		
11	8,95	4,5078	0	0		
12	9,41	4,6411	0	0		
13	9,73	8,5495	0	0		
14	9,92	129,8611	0	0		
15	10,62	7,6133	0	0		
16	11,14	13,8013	0	0		
17	11,54	10,8705	0	0		
18	11,85	9,1348	0	0		
19	12,14	14,8439	0	0		
20	12,79	24,3602	0	0		
21	13,48	9,8627	0	0		
22	14,16	17,7846	0	0		
-	Total	7417,679	3,5842	11,219		

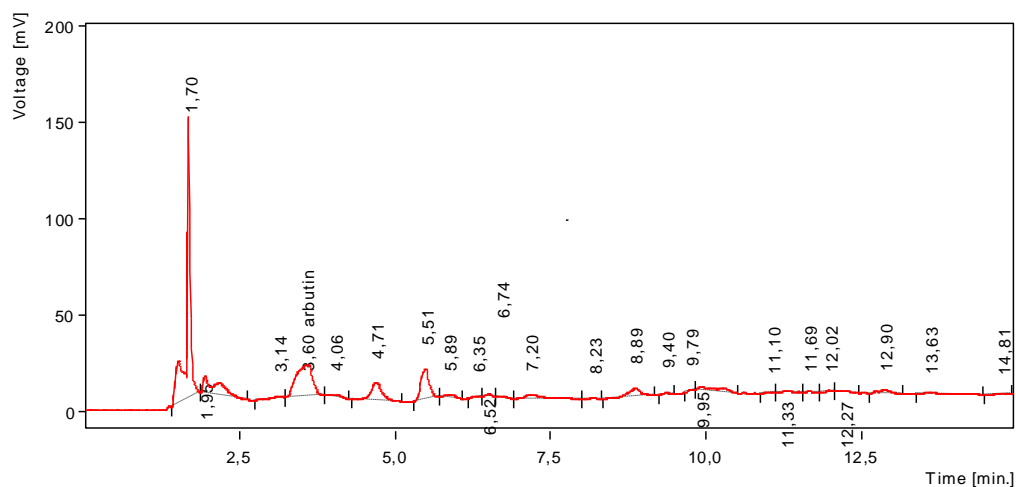
Obr.16: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekurzoru H v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 3. den



Tab.16. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekurzoru H v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 3. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,72	421,1607	0	0		
2	2,06	97,7309	0	0		
3	3,59	631,2063	0,7859	17,683	Ordnr	arbutin
4	4,77	153,6398	0	0		
5	5,55	51,8409	0	0		
6	6,01	12,9874	0	0		
7	6,64	62,3963	0	0		
8	7,35	58,1353	0	0		
9	8,01	5,9648	0	0		
10	8,36	6,8555	0	0		
11	9,04	30,3621	0	0		
12	9,56	13,2291	0	0		
13	9,96	5,302	0	0		
14	10,13	5,1291	0	0		
15	10,51	22,9677	0	0		
16	11	2,7035	0	0		
17	11,28	2,866	0	0		
18	11,49	3,5396	0	0		
19	11,86	8,4215	0	0		
20	12,2	6,2691	0	0		
21	12,48	8,106	0	0		
22	12,76	1,7582	0	0		
23	12,96	4,3703	0	0		
24	13,14	8,8286	0	0		
25	13,79	23,5679	0	0		
-	Total	1649,339	4,4444	17,683		

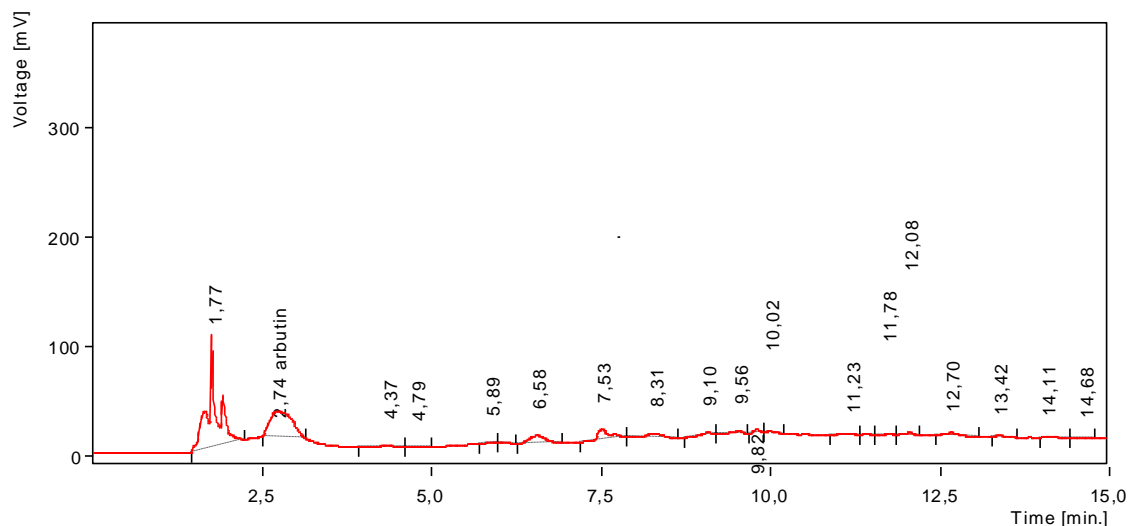
Obr.17: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekurzoru H v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 4. den



Tab.17. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekurzoru H v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 4. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,7	621,469	0	0		
2	1,95	148,5698	0	0		
3	3,14	7,1166	0	0		
4	3,6	303,5883	0,2883	8,505	Ordnr	arbutin
5	4,06	17,2307	0	0		
6	4,71	120,0048	0	0		
7	5,51	146,2804	0	0		
8	5,89	18,8916	0	0		
9	6,35	5,899	0	0		
10	6,52	9,1639	0	0		
11	6,74	7,5865	0	0		
12	7,2	52,1536	0	0		
13	8,23	4,3781	0	0		
14	8,89	64,0796	0	0		
15	9,4	5,639	0	0		
16	9,79	4,186	0	0		
17	9,95	49,8931	0	0		
18	11,1	1,6143	0	0		
19	11,33	7,3255	0	0		
20	11,69	3,2063	0	0		
21	12,02	5,3887	0	0		
22	12,27	9,6132	0	0		
23	12,9	26,885	0	0		
24	13,63	24,9025	0	0		
25	14,81	3,9465	0	0		
-	Total	1669,012	3,39	8,505		

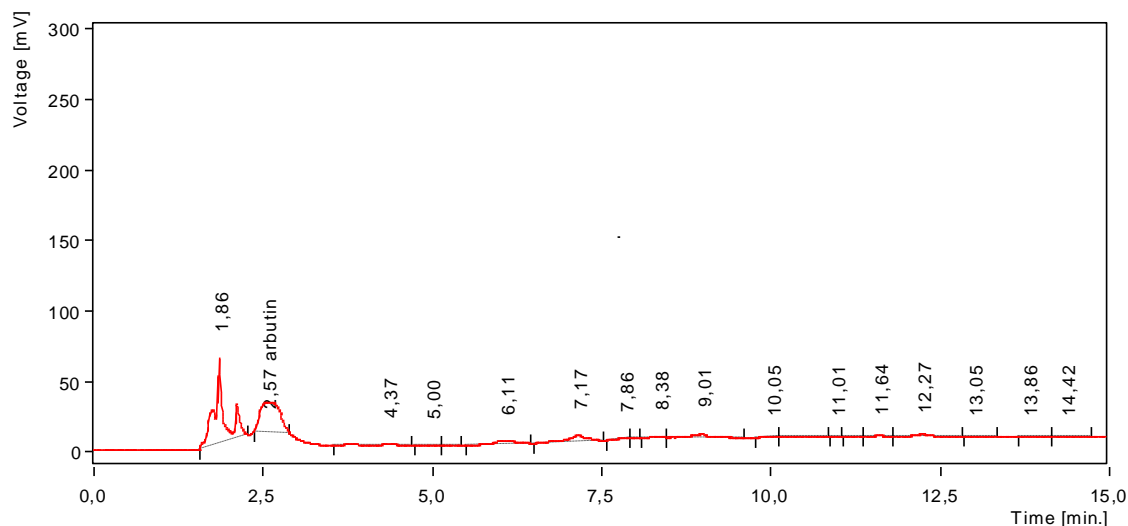
Obr.18: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 5. den



Tab.18. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 5. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,77	942,5039	0	0		
2	3,74	542,2869	0,4279	15,192	Ordnr	arbutin
3	4,37	24,9826	0	0		
4	4,79	7,0919	0	0		
5	5,89	7,7903	0	0		
6	6,08	7,5073	0	0		
7	6,58	124,3584	0	0		
8	7,53	119,7212	0	0		
9	8,31	66,2445	0	0		
10	9,1	24,3495	0	0		
11	9,56	36,1023	0	0		
12	9,82	18,275	0	0		
13	10,02	10,9395	0	0		
14	11,23	9,6998	0	0		
15	11,45	7,0323	0	0		
16	11,78	4,9335	0	0		
17	12,08	18,877	0	0		
18	12,7	41,0531	0	0		
19	13,42	13,7956	0	0		
20	14,11	18,3773	0	0		
21	14,68	9,3011	0	0		
-	Total	2055,223	2,8169	15,192		

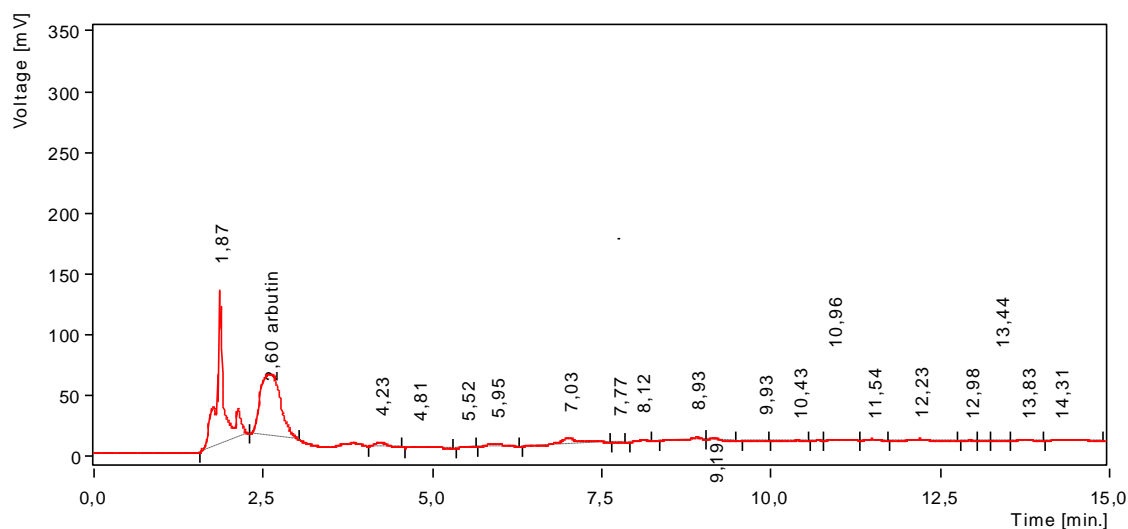
Obr.19: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 6. den



Tab.19. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 6. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,86	584,8378	0	0		
2	3,57	441,3276	0,6406	12,364	Ordnr	arbutin
3	4,37	36,3297	0	0		
4	5	3,6876	0	0		
5	5,29	3,4261	0	0		
6	6,11	54,1168	0	0		
7	7,17	90,4453	0	0		
8	7,86	4,9444	0	0		
9	8,04	0,7029	0	0		
10	8,38	6,187	0	0		
11	9,01	57,2543	0	0		
12	10,05	3,6666	0	0		
13	10,36	8,92	0	0		
14	11,01	1,4415	0	0		
15	11,31	1,1462	0	0		
16	11,64	6,82	0	0		
17	12,27	31,8358	0	0		
18	13,05	5,8434	0	0		
19	13,86	8,5433	0	0		
20	14,42	6,299	0	0		
-	Total	1357,775	5,1813	12,364		

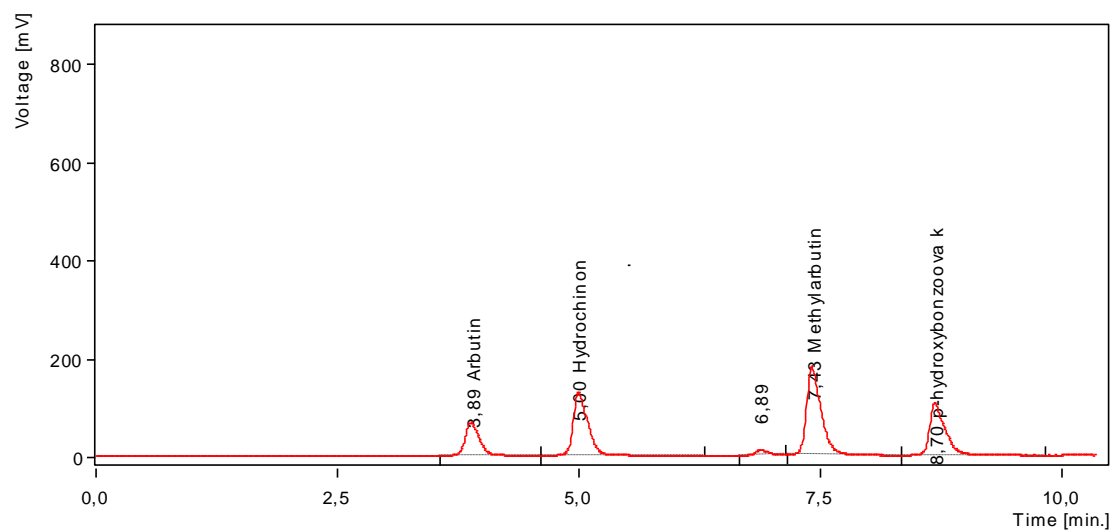
Obr.20: Chromatogram extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, interval odběru 8. den



Tab.20. Výsledky HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis* po přidání prekursoru H v koncentraci 200 mg/l, doba odběru 8. den

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,87	967,9466	0	0		
2	3,6	1072,298	1,1145	30,04	Ordnr	arbutin
3	4,23	48,331	0	0		
4	4,81	14,0426	0	0		
5	5,52	9,7497	0	0		
6	5,95	47,5292	0	0		
7	7,03	128,6833	0	0		
8	7,77	2,9554	0	0		
9	8,12	10,669	0	0		
10	8,93	23,3722	0	0		
11	9,19	15,121	0	0		
12	9,93	2,7531	0	0		
13	10,43	10,6864	0	0		
14	10,73	2,0857	0	0		
15	10,96	9,6127	0	0		
16	11,54	17,1546	0	0		
17	12,23	33,1033	0	0		
18	12,98	4,2584	0	0		
19	13,18	1,9763	0	0		
20	13,44	3,1348	0	0		
21	13,83	12,6883	0	0		
22	14,31	23,7887	0	0		
-	Total	2461,94	3,71	30,04		

Obr.21: Chromatogram standardů (A, H, MA, PMF) HPLC analýzy extraktu kalusu *Schisandra chinensis*



Obr.22: Kalusové kultury *Schisandra chinensis*



Obr.23: Kalusové kultury *Schisandra chinensis* na můstcích



6. Diskuse

Explantátové kultury slouží jako alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře. Předností je možnost vést proces za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech, jak je tomu u pěstování rostlin, o kterém jsem se zmiňovala v úvodu své práce. Výsledné produkty jsou po kvalitativní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur. Tímto způsobem je rovněž možno usnadnit si získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.

Mým úkolem bylo studium biotransformačních schopností kultury *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. po přidání exogenních prekurzorů. K pokusům byly použity kalusové kultury kultivované na živném médiu podle Murashigeho a Skooga /67/ s přídavkem 2,4-D (0,1 mg/l). Jako prekurzory arbutinu byly použity hydrochinon a kyselina 4-hydroxybenzoová.

Výběr prekurzorů vycházel z přirozené biosyntetické dráhy arbutinu viz. obr. 8. Náplní mé práce bylo pokračovat v experimentálních pokusech, které byly započaty Ivanou Dindovou. /90/ Ta ve své práci použila prekurzory hydrochinon, fenylalanin, kyselinu anýzovou, skořicovou a p-kumarovou v koncentracích 100 mg/l. Odběry vzorků prováděla po 6, 12, 24 hodinách a po 1 týdnu.

V mých pokusech jsem použila jako prekurzory kyselinu 4-hydroxybenzoovou v koncentraci 200 mg/l (PHB má předchůdkyně nepoužívala) a hydrochinon v koncentracích 100, 200 mg/l (Dindová použila jen H 100 mg/l). /90/ Prekurzory byly do média přidávány s časovým odstupem tří týdnů od inokulace (v tzv. exponenciální fázi růstu), aby nedošlo k inhibici růstu tkáňové kultury. Doby působení prekurzorů byly u kyseliny 4-hydroxybenzoové 6, 12, 24, 48, 168 hodin a u hydrochinou 2, 3, 4, 5, 6, 8 dnů (doplnění časových intervalů Dindové) /90/. Po uplynutí výše zmíněných časů kultivace s prekursorem byly připraveny extrakty, odebrány vzorky živných médií a byla provedena kvalitativní a kvantitativní analýza.

V extraktech kalusů byl pomocí metody TLC prokázán arbutin po přidání prekurzoru kyseliny 4-hydroxybenzoové v koncentraci 200 mg/l po 48 a 168 hodinách, po přidání prekurzoru hydrochinonu v koncentraci 100 mg/l byl arbutin identifikován po 2, 3, 5, a 8 dnech kultivace s prekursorem. Při koncentraci

hydrochinonu 200 mg/l byl arbutin prokázán ve všech sledovaných časech 2, 3, 4, 5, 6, 8 dnech.

Hydrochinon byl pomocí TLC prokázán jen při době odběru 6 hodin po přidání prekursoru kyseliny 4-hydroxybenzoové v koncentraci 200 mg/l.

Při analýze půd metodou TLC nebyl arbutin prokázán v žádné výše zmíněné pokusné variantě. V půdách byl nalezen netransformovaný hydrochinon po přidání kyseliny 4-hydroxybenzoové po 48 hodinách, po přidání hydrochinonu v koncentraci 100 mg/l po 2, 5, a 8 dnech a při použití prekursoru hydrochinonu při koncentraci 200 mg/l byl netransformovaný hydrochinon zjištěn ve všech zkoušených časech viz. Tab.3.

Kvantitativní hodnocení bylo provedeno metodou HPLC. Tato metoda naprosto shodně s TLC metodou potvrdila přítomnost arbutinu v extraktech kalusu *Schisandra chinensis*, pro oba prekuzory.

Nejvyšší hodnoty arbutinu byly dosaženy po přidání hydrochinonu v koncentraci 200 mg/l po 3 dnech 0,78% a po 8 dnech 1,10%. Ostatní hodnoty arbutinu při odběrech po 2, 4, 5 a 6 dnech byly nižší viz. tab. 15, 17, 18, 19. Rovněž tak byly podstatně nižší hodnoty arbutinu po přidání hydrochinonu 100 mg/l viz. tab. 11 až 14 a 4-hydroxybenzoové viz. tab. 9 a 10.

Vzorky živných médií nebyly podrobeny měření HPLC vzhledem k negativním výsledkům, kterých bylo dosaženo při analýze TLC.

Ve výsledcích kolegyně Dindové HPLC analýza potvrdila přítomnost arbutinu v půdě i kalusech po přidání hydrochinonu 100 mg/l. V extraktech kalusů po 24 hodinách odpovídalo množství arbutinu 1,61%, po 7 dnech 5,08% arbutinu a 0,35% hydrochinonu. V médiu po 7 dnech bylo naměřeno 0,18% arbutinu.

Při TLC i HPLC se ve výsledcích objevila neznámá látka. Při analýze metodou HPLC po přidání prekursoru kyseliny 4-hydroxybenzoové 200 mg/l se látka objevila

po 24, 48, 168 hodinách. TLC metodou se nám podařilo prokázat neznámou látku jen po 48 hodinách.

Po přidání hydrochinonu 100 mg/l se při analýze HPLC prokázala neznámá látka v intervalech 2, 3, 4 a 6 dnů. TLC analýzou byla detekována tato látka po 2, 6 dnech.

Identifikace neznámé látky bude předmětem dalšího výzkumu.

Důvodů proč mé výsledky dosahují nižších hodnot než u kolegyně Dindové může být více. Jedním z nich je délka pasáží, která v mém případě činila 46 až 49 a u Dindové 16 až 20. Další možností, která by mohla způsobit pokles koncentrací arbutinu je rozklad látek získaných transformací přidaných prekurzorů. Tento rozklad mohl nastat v téměř roční prodlevě mezi TLC a HPLC analýzou z důvodu poruchy kapalinového chromatografu.

Vzhledem k nízké ceně hydrochinonu jako substrátu se jeví produkce arbutinu touto cestou perspektivní.

7. Závěr

1. Byla prokázána schopnost kultury *Schisandra chinensis* glykosylovat hydrochinon na arbutin.
2. Nebylo prokázáno žádné uvolňování arbutinu do živného média kultury *Schisandra chinensis*
3. Zvýšením koncentrace prekurzoru hydrochinonu došlo ke zvýšení produkce arbutinu
4. V extraktech kalusů *Schisandra chinensis* byla po přidání prekurzorů kyseliny parahydroxybenzoové v koncentraci 200 mg/l a hydrochinonu v koncentraci 100mg/l opakovaně nalezena neznámá látka.

8. Literatura

1. Procházka S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998
2. <http://botanika.bf.jcu.cz/morgologie/MorfologieKvet.htm>
3. Leifertová I., Baloun J.: Farmaceutická botanika, systematika, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1990
4. Opletal L., Křenková M., Havlíčková P.: Fytoterapeutické aspekty onemocnění oběhového systému, Magnolka čínská (*Schisandra chinensis* (Turcz)Baill.): obsahové látky a jejich biologická aktivita, Čes. slov. Farm. 50, 173-180, 2001
5. Tolmačev A. I.: Atlas arealov i resursov lekarstvennyh rastenij. GUGK Moskva, 1980, cit. dle 4.
6. Březinová L. et al.: Analýza lignanů in vitro kultury *Schisandra chinensis*, Chem. listy 98,1031, 2004
7. Vokurka M., et al.: Velký lékařský slovník 4. aktualizované vydání, Jessenius Maxdorf Praha, 2004
8. Opletal L., Opletalová V.: Adaptogeny rostlinného původu. Pokroky ve farmacii 10, Avicenum Praha, 1990, cit. dle 4
9. Xia Y., et al.: Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 23, 230, 1998, Chem. Abstr. 130, 122157, 1999, cit. dle 4
10. Yamara S., et al.: Shoyakugaku Zasshi 47, 420 , 1993, cit. dle 4
11. Chen Ch.-Ch., et al.: J. Nat. Prod. 57, 1164, 1994, cit. dle 4
12. Lee I. S., et al.: Biol. Pharm. Bull. 22, 265, 1999, cit. dle 4
13. Liu J., Wang W., Juany M.: Zhoncayao 21, 294, 1990, Chem. Abstr. 113, 217928, 1990, cit. dle 4

14. Lee I.S., et al.: *Int. J. Pharmacogn.* 35, 358, 1997, cit. dle 4
15. Determination of lignans of *Schisandra medicinalis* plants by HPLC, Department of Pharmacognosy, China, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>, 2003
16. Wang YH., Gao JP., Chen DF.: Studies on chemical constituents from the stems of *Schisandra sphaerandra*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 28, 138-140, 2003
17. *Gossudarstvennaja farmakopeja SSSR*, Vyd. 2, Medicina Moskva, 1990, cit. dle 4
18. *The Pharmacopoeia of Japan 9th Ed.*, Ministry of Health and Welfare, 1981, cit. dle 4
19. *Pharmacopoea Sinica, Part I*, Ministry of Health of the People Republic of China, Beijing 1960, cit. dle 4
20. Ikeya I., Okada M., Mitsuhashi H.: *Phytochemistry* 30, 975, 1991, cit. dle 4
21. Hua L., Geng-Rao L.: *Planta Med.* 58, 311, 1992, cit. dle 4
22. Chang H.-M., But P.-H.: *Pharmacology and Application of Chinese Materia Medica*. World Scientific, Singapore 1986, cit. dle 4
23. *Chinese Herbal Medicine, Materna Meica*. Eastland Press, Seattle 1990, cit. dle 4
24. Tang. W., Eisenbrand H.: *Chinine Drugs of Plant Origin*. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 1992, cit. dle 4
25. Gičev J. P.: *Usp. Fiziol. Nauk* 21, 23, 1990, cit. dle 4
26. Panossian A. G., et al.: *Phytomedicine* 6, 17, 1999, cit. dle 4
27. Tsutsui H., et al.: *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 84, 670, 1987, *Chem. Abstr.* 107, 127117, 1987, cit. dle 4

28. Kubo S., et al.: *Planta Med.* 58, 489, 1992, cit. dle 4
29. Nomura M., et al.: *Anticancer. Res.* 14, 1994, cit. dle 4
30. Liu T.Y., et al.: *Cancer Lett.* 89, 201, 1995, cit. dle 4
31. Zhao B.L., et al.: *Cell. Biol. Int. Rep.* 14, 99, 1990, cit. dle 4
32. Lu H., Liu G.: *Planta Med.* 58, 311, 1992, cit. dle 4
33. Wang.L.W., et al.: Primary research of pharmacological effects of PEC on mice, Institute of medicinal Plant Development, Search PubMed, 15706926, 2004
34. Lee Y.J., et al.: Extracts from *Schizandra chinensis* fruit activate estrogen receptors: a possible clue to its effects on nitric oxide-mediated vasorelaxation, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 166-1069, 2004
35. Amaryan G., et al.: Double-blind, placebo-controlled, randomized, pilot clinical trial of ImmunoGuard a standardized fixed combination of *Andrographis paniculata* Nees, with *Eleutherococcus senticosus* Maxim, *Schizandra chinensis* Bail. and *Glycyrrhiza granda* L. extracts in patients with Familial Mediterranean Fever, *Phytomedicine* 10, 271-285, 2003
36. Kang S.Y., et al.: ESP-102, a standardized combined extract of *Angelica giga*, *Saururus chinensis* and *Schizandra chinensis*, significantly improved skopolamine-induced memory impairment in mice, *Life Sci.* 76, 1691-1705, 2005
37. Procházka S., et al.: *Regulátory rostlinného růstu*, Academia Praha, 1997
38. Hua L., Geng-Rao L.: *Planta Med.* 58, 311, 1992, cit. dle 37
39. Chang H.-M., But P.-H.: *Pharmacology and Application of Chinese Materia Medica*. World Scientific Singapore, 1986, cit. dle 37

40. Chinese Herbal Medicine, Materia Medica. Eastland Press Seattle, 1990, cit. dle 37
41. Tang W., Eisenbrand H.: Chinese Druha of Plant Origin. Springer-Verlag Berlin – Heidelberg – New York, 1992, cit. dle 37
42. Gičev J. P.: Usp. Fiziol. Nauk 21, 23, 1990, cit. dle 37
43. Panossian A., Wagner H.: Stimulating effect of adaptogenus: an overview with particular reference to their efficacy following single dose administration, Phytother. Res. 19, 819-838, 2005
44. Panossian A. G., et al.: Phytomedicine 6, 17, 1999, cit. dle 37
45. Řeřábek J., Opatrný Z.: Kultury rostlinných extraktů in vitro, Biol. listy 36, 206-222, 1971
46. Řeřábek J., Opatrný Z.: Kultura rostlinných explantátů in vitro, Biol. listy 37, 298-313, 1972
47. Novák J.F.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Academia Praha, 1990
48. Skyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha, 2001
49. Jahodář L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum Praha, 1995
50. Pinkas H., et al.: Bull. Soc. Chim. Fr. 6, 1967, cit. dle 37
51. Hubík J., Dušek J., Spilková J.: Farmakognosie 1. Obecná část a primární látky, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1989
52. Dostál R.: Gartenbauwiss. 16, 196-206, 1941, cit. dle 37

53. Havel L., Novák F. J.: *Sci. Hort.* 27, 209-214, 1985, cit. dle 37
54. Haberlandt G.: *Sitzungsber. K. Preuss. Akad. Wiss.* 16, 318-345, 1913, cit. dle 37
55. Jablonski J. R., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 7, 16-24, 1954, cit. dle 37
56. Skoog F., Miller C. O.: *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131, 1957, cit. dle 37
57. Horgan R.: In: Kamínek M., Mok D. W. S., Zažímalová E., (eds): *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. SPB Acad. Ypublishing, The Hague, 429-436, 1992, cit. dle 37
58. Strnad M. et al.: *Plant Physiol.* 99, 74-80, 1992, cit. dle 37
59. Letnam D. S., Palni L.M.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34, 163-197, 1983, cit. dle 37
60. Kamínek M.: *Trends Biotechnol.* 10, 159-164, 1992, cit. dle 37
61. McGaw B. A. et al.: *Planta* 176, 230-234, 1998, cit. dle 37
62. Šebánek J., et al.: *Plant Physiology Elsevier, Amsterdam*, 1992, cit. dle 1
63. Cutler H. G., Yokota T., Adem G.: *Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications* Am. Chem. Soc., Washington 1991, cit. dle 1
64. Iwasaki T., Shibaoka H.: *Plant Cell Physiol.* 32, 1007-1014, 1991, cit. dle 37
65. Yopp J. H., Mandava N. B., Sasse J. M.: *Physiol. Plant.* 53, 445-452, 1981, cit. dle 37
66. Arteca R. N., Tsai D. S., Schlanghauser C., Mandava N. B.: *Physiol. Plant.* 59, 538-544, 1983, cit. dle 37

67. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15, 473, 1962
68. Toivonen L.: *Plant Cell, Rep* 11, 1992, 197, cit. dle 37
69. Pawuereau-Trapy F., Guern J. : *Physiol. Veg.* 21, 197-204, 1983, cit. dle 37
70. Dušková J., Dušek J.: Studium produkce vybraných metabolitů tkánovou kulturou *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) spr., a možnosti jejího ovlivnění, *Čes. slov. Farm.* 38, 257-260, 1989
71. Wellmann E.: *Planta Med.* 101,283, 1971, cit. dle 70
72. Wellmann E.: *Planta Med. (Suppl.)* 107, 1975, cit. dle 70
73. Mühlbach H. P.: *Biotechnik. Annual Review* 4, 259, 1998, 70
74. Košťiř J.: *Biochemie*, Avicenum Praha, 1974
75. Hubík J., et al.: *Obecná farmakognosie 2, sekundární látky*, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1989
76. Korbelař J.: *Naše rostliny v lékařství*, Avicenum Praha, 1970
77. Frohne D.: *Planta Med.* 18, 1, 1970, cit. dle 75
78. Jahodář L., et al.: Antimikrobiální působení arbutinu a extraktu z listů medvědice léčivé in vitro, *Čes. slov. Farm.* 34, 177-178, 1985
79. Jahodář L.: Studium obsahových látek *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spr. [kandidátská disertační práce], UK v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 1981, cit. dle 78
80. Jahodář L., Seifertová I., Lisá M.: *Pharmazie* 38, 780, 1983, cit. dle 78

81. Straková A., Jahodář L., Nosálová G.: Antitussive effect of arbutin, *Pharmazie* 46, 611-612, 1991
82. Suchopár J., et al.: *Remedia kompendium*, 3 vydání, Panax Praha, 1999
83. Boissy Raymond E., Visscher M., DeLoung M.: DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency, *Exp. Dermatol.* 14, 601-608, 2005
84. Zahuang-qun Y., et al.: The effects of aloesin and arbutin on cultured melanocytes in a synergetic method, *Journal of Plastic Surgery* 20, 369-371, 2004
85. Dušková J., Jahodář L., Dušek J.: *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. A cv. *Arbuta in vitro* – studium vlivu prekurzorů, *Čes. slov. Farm.* 39, 452-455, 1990
86. Dušková J. et al.: Arbutin, salicin – možnosti jejich biotechnologické produkce, *Čes. slov. Farm.* 54, 78-81, 2005
87. Dušková J., Jahodář L., Dušek J.: *Pharmazie*, 49, 624, 1994, cit. dle 86
88. Dušková J., Jahodář L., Dušek J.: *Herba pol.*, 45, 23, 1999, cit. dle 86
89. Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum Praha, 2001
90. Dindová I.: *Explantátové kultury vyšších rostlin 21. [Diplomová práce] Uk v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové*, 2003