

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

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

Hradec Králové, duben 2021

Klára Teplá

Poděkování

Velké poděkování patří mé školitelce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborný dohled a poskytnutí cenných informací při samotném vypracování diplomové práce. Dále velmi děkuji PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za stanovení výsledků metodou HPLC analýzy. A zároveň také děkuji členům Katedry farmakognozie za vstřícný přístup během provádění experimentální části.

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

V Hradci Králové, duben 2020

Klára Teplá

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE	7
3	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1	TŘEZALKA TEČKOVANÁ – <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> L.	8
3.1.1	Základní charakteristika a taxonomie	8
3.1.2	Mikroskopie	9
3.1.3	Droga	9
3.1.4	Obsahové látky	10
3.1.5	Biologické účinky a použití drogy	12
3.1.6	Lékové interakce	13
3.1.7	Nežádoucí účinky	15
3.2	FLAVONOIDY A HYPEROSID	16
3.3	EXPLANTÁTOVÉ KULTURY ROSTLIN	18
3.3.1	Druhy explantátových kultur	19
3.4	PODMÍNKY PRO KULTIVACI <i>IN VITRO</i>	20
3.4.1	Kultivační média	20
3.4.2	Fyzikální podmínky kultivace	24
3.5	FYZIOLOGIE STRESU	25
3.5.1	Průběh stresové reakce	26
3.6	OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ METODOU ELICITACE	26
3.6.1	Elicitace	27
3.6.2	Elicitory	27
3.6.3	Faktory ovlivňující elicitaci	32
3.6.4	Mechanismy elicitace	32
3.7	PYRIDINY	34
3.7.1	Deriváty pyridinu jako abiotické faktory	36
3.7.2	2-(4-chlorfenyl)- <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid	37
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1	CHEMIKÁLIE	38
4.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	39
4.3	KULTIVACE <i>IN VITRO</i>	40
4.3.1	Kultura <i>Hypericum perforatum</i> L.	40

4.3.2	Příprava kultivačního média	40
4.3.3	Příprava kalusových a suspenzních kultur	41
4.4	ELICITACE.....	42
4.4.1	Postup přípravy elicitoru.....	42
4.4.2	Elicitace <i>in vitro</i>	43
4.5	STANOVENÍ OBSAHU.....	44
4.5.1	Příprava vzorků k HPLC analýze	44
4.5.2	Metoda HPLC	45
4.5.3	Vlastní HPLC analýza	45
4.6	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	49
5	VÝSLEDKY	51
5.1	TABULKY	51
5.2	GRAFY	55
6	DISKUZE.....	59
7	ZÁVĚR.....	64
8	POUŽITÁ LITERATURA	65
9	ABSTRAKT.....	70
10	ABSTRACT.....	71

1 ÚVOD

V současné době se rostlinám přikládá význam zejména ve farmaceutickém průmyslu, kde využíváme širokou škálu jimi produkováných bioaktivních látek, sekundárních metabolitů, k syntéze mnoha léčiv. Mimo léčiv se tyto látky uplatňují v potravinářském průmyslu, a to především jako potravinářská barviva, korigencia chuti a vůně nebo biopesticidy.

Sekundární metabolity představují početnou skupinu látek zahrnující alkaloidy, terpeny, saponiny, flavonoidy, steroidy, kumariny a další. Jejich produkce v přírodě nebývá vysoká, neboť závisí na prostředí, ve kterém se rostlina nachází a jejích fyziologických a vývojových aspektech. Obvykle toto množství nečiní ani 1 % z celkové sušiny rostliny (1,2).

Struktura přírodních látek je na rozdíl od těch syntetických velmi složitá. Kvůli časové a finanční náročnosti bývá i jejich chemická syntéza ztížená nebo často i neproveditelná. Protože poptávka po těchto látkách velmi roste, byly vyvinuty metody, díky kterým je možné hladiny sekundárních látek ovlivnit. Využití zde našly explantátové kultury, které se kultivují *in vitro*, tedy v umělých podmínkách v laboratoři. Problémem bylo zjištění, že mnohdy kultury *in vitro* produkují méně sekundárních metabolitů, než je tomu v přírodě.

Postupný vývoj přinesl jednu z metod, jejíž podstatou je vyvolání stresové reakce u rostliny. Tento proces nazýváme elicitací. Jedná se o elicitory biotické a abiotické, které stojí za stimulací tzv. obranného mechanismu rostliny spočívající ve zvýšené syntéze a kumulaci sekundárních látek (1,2).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je obeznámit se s podstatou kultivace rostlinných explantátů *in vitro*. Zjistit, jaký význam má abiotický elicitor 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid na produkci sekundárního metabolitu hyperosidu v kalusových a suspenzních kulturách rostliny *Hypericum perforatum* L. Následně pomocí metody HPLC stanovit, zda je elicitor schopen pozitivně ovlivnit produkci tohoto flavonoidu a současně sledovat jeho případné uvolňování do odpovídajících živných médií.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 TŘEZALKA TEČKOVANÁ – *HYPERICUM PERFORATUM* L.

Třezalka tečkovaná patří mezi rostliny z čeledi *Hypericaceae* neboli třezalkovité. Jedná se o jednu z nejstarších bylin, která je velmi dobře prozkoumána. Na základě svých účinků na organismus se označuje za bylinu léčivou. Je rozšířená po celém světě, a to zejména na území tropů a subtropů (severní Amerika), výjimkou nejsou ani oblasti mírného pásma konkrétně v Evropě a východní Asii (3,4).

3.1.1 Základní charakteristika a taxonomie

Dnes je známo více než 500 druhů rodu *Hypericum*. Významné pro všechny zkoumané druhy z hlediska vlastností jsou jejich názvy a nomenklatura, jenž někdy bývá velkým problémem (4). Velmi rozšířeným je druh *Hypericum perforatum* L., který pod sebe zařazuje celkem 4 poddruhy. Z hlediska morfologické podobnosti a původu se předpokládá, že *Hypericum perforatum* je tzv. hybridem mezi *Hypericum maculatum* a *Hypericum attenuatum* (5). Do této čtyřčlenné skupiny řadíme:

- *H. perforatum* subsp. *perforatum* (Asie)
- *H. perforatum* subsp. *chinense* (Čína)
- *H. perforatum* subsp. *songaricum* (Asie)
- *H. perforatum* subsp. *veronense* (Asie → Středomoří) (4)

Bylina obvykle dosahuje výšky od 30 do 60 cm. Její lodyha je tuhá, lysá, větvená a někdy má viditelné dvě hrany. Lodyhu zakončuje květenství vidlanů tvořené pravidelnými pětičetnými žlutými květy kvetoucích od června do srpna. Nekvetoucí lodyhy bývají hustě olistěné. Listy jsou vejčité, celokrajné, vstřícně uspořádané a typicky se vyznačují prosvítavým tečkováním. Světlé tečky představují siličné žlázy, zatímco tečky černých nádržek obsahují červené barvivo hypericin (6,7). Obsah těchto naftodiantronů je v přímé úměře s počtem nádržek a jejich velikostí (3). Ve skutečnosti siličnými žlázkami označujeme schizogenní mezibuněčný prostor tvořený zploštělými

buňkami. Na vrchu mají listy krátce řapíkaté, spodní bývají přisedlé. Lístky kališní jsou tvaru kopinatého až protáhle vejčitého. Tyčinky jsou uspořádány do tří svazků, z nichž svrchní semeník se postupně po oplození přeměňuje ve žláznatou tobolku s pryskyřičnými nádržkami (6).

3.1.2 Mikroskopie

Pro drogu *Hyperici herba* je typické zelenožluté zbarvení. Pokožku listu tvoří protáhlé buňky uspořádané do pletiva, tzv. palisádového parenchymu. Parenchym je prostoupen viditelnými velkými červeně zbarvenými nádržkami. Buňky svrchní pokožky jsou ztlustlé, naproti tomu na spodní straně listu se vyskytují buňky tenkostěnné. Pokožka obsahuje průduchy, které jsou obklopeny různým počtem buněk. Najdeme zde průduchy paracytické, anizocytické a anomocytické. Cévy mají síťovité nebo tečkovaně ztlustlé. Lodyha je zdřevnatělá a tvořená čtyřhrannými buňkami. Pylová zrna se mohou vyskytovat jednotlivě nebo ve shluku. Obvykle mají tři klíční póry a hladkou exinu (8).



Obrázek 1: Nádržky s hypericinem (9)



Obrázek 2: Siličné žlázky (9)

3.1.3 Droga

Drogu najdeme v lékopisech mnoha zemí (10). V Českém lékopise 2017 se setkáme se dvěma monografiemi, ve kterých je uvedena třezalková nať (*Hyperici herba*) a kvantifikovaný suchý extrakt z třezalkové natě (*Hyperici herbae extractum siccum*)

quantificatum). Jedná se o celé nebo nařezané kvetoucí vrcholky, které jsou sušeny. Vysušená droga by měla obsahovat alespoň 0,08 % hypericinů. Je vhodné ji uchovávat v dobře uzavřeném obalu a chráněnou před světlem (8).

3.1.4 Obsahové látky

Obsahové látky představují z velké části biologicky aktivní složky – sekundární metabolity. Jejich výskyt a obsah kolísá v závislosti na genetice, klimatických podmínkách, kvalitě půdy, období sklizně, zpracování, skladování a expozici světlu (11,12). Do skupiny těchto sloučenin řadíme:

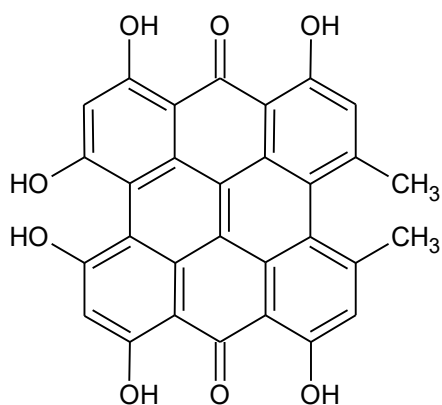
- Floroglucinoly (hyperforin, adhyperforin)
- Naftodianthrony (hypericin, pseudohypericin)
- Flavonoidy (kvercetin, hyperosid)
- Biflavony (biapigenin, amentoflavon)
- Fenypropány (kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina ferulová)
- Proanthocyanidiny
- Xanthony
- Další složky: terpeny, uhlovodíky, aminokyseliny (13,14)

Jejich účinky jsou stimulační i inhibiční na různé biologické procesy u člověka a zvířat. O výsledném fyziologickém účinku rozhoduje použití celého preparátu *Hypericum perforatum* L. či účinek samotné aktivní substance. Efekt většiny sloučenin se vzájemně potencuje (10).

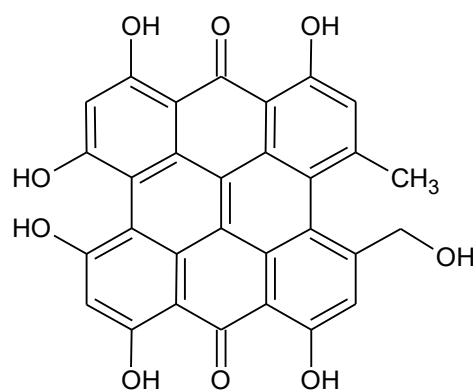
Jedny z nejvýznamnějších aktivních sloučenin z terapeutického hlediska představují floroglucinoly a naftodianthrony. Jejich aktivita souvisí především s antidepresivním, antimikrobiálním a antikancerogenním efektem. Skupina biflavonů není doposud nijak terapeuticky významná. Prokázalo se, že se *in vitro* váží na benzodiazepinové receptory v mozku, avšak biflavony nemají schopnost projít přes encefalickou bariéru. Proanthocyanidiny se vyskytují ve formě taninové frakce, jejíž

účinky jsou hlavně antioxidační, antivirotické, antimikrobiální a vazoaktivní. V siličných kanálcích listů třezalky nacházíme typické terpeny jako jsou α -pinen, β -pinen, limonen, myrcen, větší množství uhlovodíků a alkoholy s dlouhým řetězcem (13). α -pinen se z nich vyskytuje nejčastěji (10).

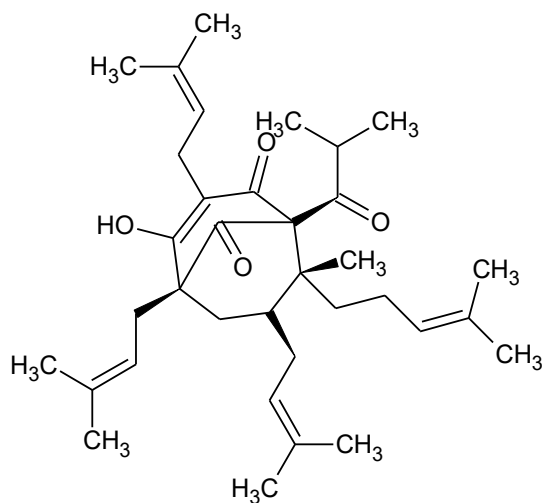
Chemické struktury nejvýznamnějších sekundárních metabolitů třezalky tečkované (*Hypericum perforatum* L.) (15):



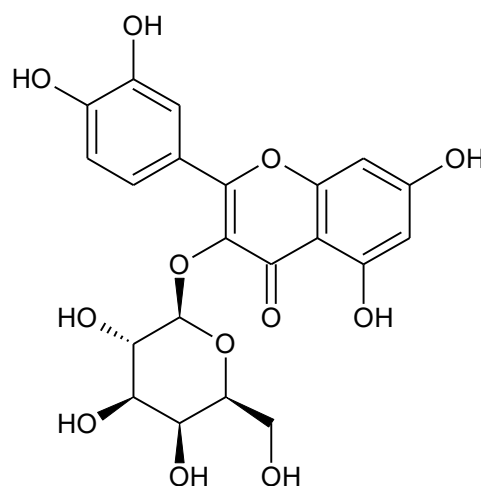
Obrázek 3: Hypericin



Obrázek 4: Pseudohypericin



Obrázek 5: Hyperforin



Obrázek 6: Hyperosid

3.1.5 Biologické účinky a použití drogy

Již po staletí se třezalka tečkovaná využívá k vnitřnímu a vnějšímu podání v léčbě mnoha obtíží (16). Působí především jako antidepresivum, sedativum, mírné antiflogistikum a účinná je také v léčbě trávicích potíží (6). Standardizované extrakty jsou efektivní v terapeutické dávce 300-400 mg třikrát denně. K přípravě nálevu nebo odvaru se používá jednotlivá dávka drogy 1,5 g (17,18). Při vnitřním podání není pro dostatečné důkazy doporučováno překračovat dobu léčby delší než 8-12 týdnů (19).

Problémem bývají nejednotné důkazy o účinnosti a standardizaci rostlinných produktů. Pacienti by proto měli být poučeni o kvalitě a obsahu jednotlivých doplňků stravy s obsahem třezalky tečkované (18).

Dnes je třezalka tečkovaná nejvíce známá pro své antidepresivní účinky využívané při terapii mírných až středně těžkých forem depresí (19). Extrakt působí více mechanismy na snížení přenosu signálu mezi neurony v mozku. Za hlavním terapeutickým účinkem v léčbě deprese stojí hyperforin, který významně inhibuje synaptické zpětné vychytávání serotoninu, dopaminu, noradrenalinu, kyseliny γ -aminomáselné a L-glutamátu. Hypericin především blokuje enzym monoaminoxidázu (MAO) degradující katecholaminy (11,13). Při krátkodobé léčbě deprese je třezalka stejně účinná jako standardní antidepresiva a může tedy zastat úlohu přírodní alternativy (19,20). Mimo to působí sedativně a tím vykazuje pozitivní efekt proti neklidu a nespavosti (18).

Zevně je používána pro svůj protizánětlivý, antimikrobiální a antioxidační účinek při hojení ran a drobných poranění kůže, jako jsou popáleniny, oděrky, modřiny, dále také atopické ekzémy a vitiligo. Významná v hojení ran je adstringentní aktivita taninu. Lokálně se používají macerovaný třezalkový olej z čerstvých nebo sušených květů, tinktury a vyvinuty byly také masti, krémy a gely (17,18,21).

Hyperforin vykazuje *in vitro* antibakteriální aktivitu proti meticilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* a dalším grampozitivním bakteriím, jako jsou *Streptococcus pyogenes* a *Corynebacterium diphtheriae*. Hypericin navíc jeví efekt i proti gramnegativním bakteriím (11,16,18). Mimo jiné účinkuje na různé typy virů (16). Pozitivní účinek vykazuje proti retrovirům, který je navozený inhibicí proteinkinázy C. Některé studie popisují také inhibici herpes simplex virů typu 1 a 2 (18).

Několik randomizovaných placebem kontrolovaných studií hovoří o důkazu ohledně účinnosti extraktu při menopauzálních potížích zejména na snížení četnosti a závažnosti návalů horka (18). Svými vlastnostmi je navíc ku prospěchu ženám mající v klimakteriu psychické potíže (22).

Využití hypericinu jako fotosenzibilizátoru je do budoucna velkým potenciálem pro protinádorovou fotodynamickou terapii a fotodynamickou diagnostiku. Vyznačuje se určitou selektivitou k neoplastické tkáni, nízkou toxicitou ve tmě a silným fototoxickým účinkem při aktivaci světlem. Světelná expozice odpovídá za silnou proapoptickou vlastnost hypericinu, dále působí antikancerogenně, antiproliferativně, antiinvazivně, antimetastazicky a antiangiogenně (16,23).

3.1.6 Lékové interakce

Při užívání třezalky tečkované je velmi důležité zohlednit farmakokinetické a farmakodynamické interakce s ostatními podávanými léčivy, které se významně podílejí na celkové bezpečnosti podávané drogy. Třezalka působí významnou indukci enzymů cytochromu P450 na izoformách CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A4. Nejvíce prokázaných interakcí probíhá na izoformě CYP3A4. Mimo jiné indukuje efluxní transportér P-glykoprotein na apikální straně buněk intestina, který zajišťuje absorpci nebo eliminaci mnoha léčiv (20,24). Některá léčiva, často pro život zásadně důležitá, zde působí jako substráty. Tím dochází k poklesu jejich plazmatických koncentrací a snížení účinnosti (19). Zahrnujeme sem zejména některá imunosupresiva, léčiva mající vliv na kardiovaskulární systém, protinádorová léčiva, theofylin a perorální kontraceptiva (20).

V jedné ze studií byly hlášeny dva případy selhání léčby cyklosporinem v důsledku užívání třezalky tečkované, kdy došlo k rejekci transplantátu srdce (18).

Z farmakodynamického hlediska popisujeme především zvýšení hladiny serotoninu. Interakce nastává se selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, jako jsou antidepresiva ze skupiny SSRI nebo agonisté serotoninových receptorů – triptany. Riziko je spojeno se zvýšenou četností nežádoucího serotoninového syndromu. Ten je charakterizován zmateností, agitovaností, třesem, pocením, hyperreflexií, dále se může vyskytovat nevolnost, průjem a výjimečně kóma (24).

Klinické studie naznačují vliv hyperforinu na silnou indukci CYP3A4 a P-glykoproteinu. Jeho množství v extraktu *Hypericum perforatum L.* udává rozsah interakce s ostatními léčivy. Nízký obsah by potenciálně mohl snižovat interakce na úrovni farmakokinetiky (20).

Tabulka 1: Farmakokinetické a farmakodynamické interakce třezalky tečkované s konkrétními léčivými (20,24).

LÉČIVO	SUBSTRÁTY NA IZOFORMÁCH:				
FARMAKOKINETICKÉ INTERAKCE	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4	P-GLYKOPROTEIN
cyklosporin				X	X
orální kontraceptiva	X	(X)		X	
warfarin	(X) (R)- warfarin	X (S)- warfarin		(X) (R)- warfarin	
digoxin					X
verapamil				X	
theofylin	X				
inhibitory HIV – proteáz				X	X
cytostatika (irinotekan, imatinib)				X	
anxiolytika (alprazolam, midazolam)				X	
simvastatin				X	X
omeprazol			X		
FARMAKODYNAMICKÉ INTERAKCE					
SSRI, SNRI, IMAO, TCA	↑ koncentrace serotoninu				
triptany	↑ koncentrace serotoninu				

3.1.7 Nežádoucí účinky

Ačkoliv se informace o výskytu nežádoucích účinků mírně liší, jejich incidence nebývá vysoká a většinou se předpokládá dobrá tolerance (12). Mohou se vyskytnout mírné gastrointestinální potíže, závratě/zmatenost, únava/sedace, nespavost, bolest hlavy nebo sucho v ústech (19,24).

Nejvýznamnější nežádoucí reakce spojená s užíváním třezalky tečkované vzniká při expozici slunečnímu a UV-A záření. Je známo, že sloučeniny hypericinu se projevují vysokou fototoxicitou na kůži. Klíčový je vznik podstatně velkého množství reaktivních forem kyslíku a poškození různých oblastí těla včetně očí. Na pokožce vzniká erytém a výjimečně může dojít až k popáleninám druhého stupně s následným zjizvením, tzv.

hypericismu. Na rozdíl od hypericinu, pseudohypericin tento účinek nevykazuje (13,18,25). Studie naznačují, že tato reakce je pozorována častěji při užívání vyšších dávek, po delší dobu a u citlivějších jedinců. Jedinci se světlou pletí jsou postiženi více. Toto přesvědčení vzešlo z důkazů, kdy byla třezalka zkoušena u zvířat, konkrétně u skotu s bledou pokožkou, a docházelo k výrazným spáleninám kůže (24).

In vitro prováděná studie také odhalila, že vyšší koncentrace mohou negativně působit na oocyty a mít mutagenní efekt na spermie. Získané informace vedou k obavám o snížení plodnosti (18).

3.2 FLAVONOIDY A HYPEROSID

Skupina flavonoidů je odvozena od struktury 2-fenylchromanu. Navzájem se od sebe liší stupněm oxidace pyranového kruhu. Deriváty druhu *Hypericum perforatum* L. řadíme konkrétně do skupiny flavonolů. Jenotlivé metabolity se odlišují počtem hydroxylových skupin a glykosidně vázanou sacharidovou složkou (17). Řadíme sem kvercetin, hyperosid, kvercitrin, isokvercitrin a rutin. Hyperosid je glykosid kvercetinu konjugovaný s galaktózou (26). Jejich obsah v rostlině bývá okolo 2-4 % (14).

Terapeutické využití flavonoidů je široké. Z biologického hlediska se obecně vyznačují antikancerogenním, kardioprotektivním a antioxidačním efektem (26). Normalizují permeabilitu kapilár a odstraňují jejich lomivost. Jsou účinné proti mikrobům a v kombinaci s vitamínem C se používají při podpůrné léčbě infekcí (17). Některé flavonolové glykosidy působí spasmolyticky. Také ovlivňují serotoninergní a noradrenergní systém, avšak samostatně terapeutický účinek nevyvolávají kvůli jejich nízké obsahové hladině. Proto se v léčbě deprese kombinují především s naftodianthrony a floriglucinoly (13).

Hyperosid a ostatní flavonoidy jsou významně spojeny s antioxidační aktivitou, která brání reaktivním formám kyslíku (ROS) působit cytotoxicitu (26). Silnou antioxidační schopnost má hydroxylová a fenolická skupina (27). Tyto funkční skupiny

vychytávají volné radikály a/nebo chelatují ionty kovů, především železo a měď. Mimo konfiguraci, substituci a celkového počtu těchto skupin odpovídá za míru antioxidační aktivity také přítomnost cukerné složky. Vyšší efekt mají aglykony oproti jejich odpovídajícím glykosidům (28). Předpokládá se, že hlavní roli v ochraně tkání proti oxidační reakci má indukce tělu vlastních enzymových systémů – chinon oxidoreduktázy, superoxid dismutázy a hemoxygenázy-1 (26). Další mechanismus spočívá v inhibici enzymů zapojujících se do biochemických procesů, ve kterých dochází ke tvorbě ROS, především monooxygenázy, glutathion S-transferázy, mitochondriální sukcinoxidázy a NADH oxidázy (26,28).

U třezalkového extraktu je popisována neuroprotektivní aktivita. Neuroprotektce je zajišťována přímými a nepřímými mechanismy, přičemž může působit cytoprotektivně (přímý mechanismus), anebo tento účinek zajišťuje pomocí antioxidačních vlastností (nepřímý mechanismus). Pravděpodobný cytoprotektivní účinek vykazují flavonoidy s cukernou složkou, naproti tomu více hydroxylových skupin působí antioxidačně (16). Byly provedeny studie na vliv hyperosidu jako neuroprotektiva na β -amyloidový protein, jenž narušuje hematoencefalickou bariéru (HEB) u Alzheimerovy nemoci (AN). Jsou důkazy, že hyperosid může mít ochranný vliv před toxicitou β -amyloidu, pravděpodobně také inhibuje fibrilární poškození HEB a její hyperpermeabilitu. Účinky vyazuje *in vitro* i *in vivo*. Je tedy potenciálním metabolitem v prevenci a/nebo léčbě narušení HEB u AN. Účinný by mohl být i u Parkinsonovy nemoci (29).

Další studie pojednává o schopnosti kvercetinu a hyperosidu ovlivnit intracelulární kumulaci triacylglycerolů, a tím snižovat zvýšené uvolňování volných mastných kyselin (MK) do krevního oběhu. Tak by se mohlo zamezit následné lipotoxicitě z cirkulujících volných MK a snížit tím mnoho rizik spojených s obezitou, jako jsou například hypertenze, kardiovaskulární potíže či diabetes mellitus 2. typu. Aktivně studován byl především kvercetin, avšak díky strukturní podobnosti se tato aktivita dá předpokládat i u hyperosidu. Takového účinku by se dalo využít v prevenci nebo léčbě obezity (27).

3.3 EXPLANTÁTOVÉ KULTURY ROSTLIN

Pojmem explantátové kultury rozumíme izolovaný materiál z rostliny – buňky s funkčním jádrem, pletiva nebo celé orgány, který podrobujeme kultivaci v umělých podmínkách *in vitro* (30,31). Prakticky se jedná o odjímání konkrétních částí předem povrchově sterilizovaných rostlin, jejich přenesení v aseptickém prostředí do vhodného živného média a následné zmnožení za stanovených podmínek (30). Kultury, které jsou v průběhu kultivace kontaminované, se vyřazují, zatímco ostatní explantáty je možno udržet v procesu i po mnoho let pomocí pasážování do nově připravených živných médií (31). Aby výsledky kultivace byly příznivé, je třeba zohlednit odebíranou část rostliny, její stáří, fyziologický stav, velikost a období odběru explantátu (32).

Každá rostlinná buňka má schopnost totipotence. Ta dává možnost buňkám diferencovat se, a tím tak ovlivňovat růst a vývoj rostliny či explantátové kultury. Projevem totipotence je regenerace, která může být přímá – dává za vznik kompletní diferencované rostlině nebo nepřímá – tvoří se kalus. Při stresové reakci může být regenerace rostliny snižena, a tak někdy dochází k úhynu kultur po jejich izolaci, prodloužení doby kultivace, kumulaci sekundárních látek vlivem delšího účinku cytokininů nebo genetickým změnám (31,32).

Využití explantátových kultur je široké. Na rozdíl od přirozených podmínek můžeme kontrolovanými podmínkami zajistit vyšší výnos, lepší kvalitu a uniformitu produktu. *In vitro* kultivace má dnes významnou roli v mikropropagaci rostlin, kdy dochází ke zmnožení, pasážování a regeneraci rostlin za vzniku identických klonů. Dále se uplatňují v rychlém množení vzácných rostlinných genotypů, transformaci rostlinného genomu nebo produkci sekundárních metabolitů. Slouží také pro ozdravování rostlin od viróz (31).

3.3.1 Druhy explantátových kultur

- Kalusové
- Suspenzní
- Buněčné
- Tkáňové
- Orgánové (meristémové, prašníkové, mikrosporové apod.)
- Protoplastové
- Embryonální (31,32)

Kalusové kultury

Tvorba kalusu je charakteristickým rysem rostlinných buněk. Jde o neorganizovanou, rychle se dělící buněčnou hmotu s různým stupněm diferenciaci, kde se jednotlivé buňky od sebe odlišují velikostí, tvarem, pigmentací či metabolismem. Z primárního explantátu se tvoří rostlinná tkáň – kalus (primokultura), která je pod regulací růstových hormonů, nejčastěji auxinů a cytokininů. Z kalusu může docházet k regeneraci rostlin – procesu organogeneze (tvorba prýtů, kořenů) a embryogeneze (vzniká celá rostlina). V *in vitro* podmínkách se kalus tvoří ve vhodném kultivačním mediu v aseptickém prostředí (2,32,33).

Suspenzní kultury

Kalusová kultura dává za vznik suspenzní kultuře. Suspenze se tvoří mechanickým rozmělněním kalusu a následným převedením do živného média, se kterým jednotlivé buňky či jejich shluky přicházejí do přímého kontaktu. Díky kontinuálnímu pohybu média okolo buněk dochází k lepšímu provzdušnění a výživě kultury, a tím i rychlejšímu růstu, než je tomu u kultury kalusové (32,34).

3.4 PODMÍNKY PRO KULTIVACI *IN VITRO*

3.4.1 Kultivační média

S ohledem na nutriční požadavky konkrétních rostlin byla vyvinuta různá živná média. Za nejčastěji používaná základní média označujeme médium Murashige a Skoog (MS), Linsmaier a Skoog (LS), Gamborg (B5) a Nitsch a Nitsch (NN) (35). Mimo obsah živin a dalších nezbytných složek potřebných pro určité druhy rostlin se od sebe liší také způsobem jejich využití při kultivaci. Média MS a LS jsou používána zejména ke kultivaci kalusových a suspenzních kultur, organogenezi a mikropropagaci rostlin (36).

K základním složkám jednotlivých médií řadíme makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo jiný zdroj dusíku, nedefinované organické složky, regulátory růstu a zpevňující složky. Zpravidla by živná půda měla obsahovat většinu z těchto složek (35).

3.4.1.1 Složení živných médií (34,35,37)

Makroelementy

Významnými makroelementy v buněčných i tkáňových médiích jsou kromě uhlíku, vodíku a kyslíku také dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra. Anorganický dusík, jako hlavní složka v půdě, by měl obsahovat alespoň 25-60 mM, aby bylo dosaženo uspokojivého růstu a morfogeneze. Využívá se ve formě nitrátů – dusičnanu draselného a amonného nebo amonných iontů. Draslík je obsažen v koncentraci mezi 20-30 mM ve formě chloridových solí nebo dusičnanů a je důležitým zdrojem pro růst buněk. Ostatní prvky se pohybují v koncentraci od 1 do 3 mM.

Mikroelementy

Mezi základní mikroživiny potřebné pro růst patří železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Chlór, jód, sodík a kobalt se do některých médií také přidávají, nicméně jejich přítomnost není pro růst nezbytná. Železo ve formě citrátové nebo vinné soli je v médiu obtížně rozpouštěno a následně vysráženo. Pro vyřešení tohoto problému se začal využívat chelát železa s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (FeEDTA).

Zdroj uhlíku

V *in vitro* kulturách využíváme často sacharózy jako zdroje uhlíku v koncentraci od 2 do 6 %. Rostlinným explantátům poskytuje autotrofní výživu, které nejsou samy dostatečně schopné.

Vitamíny a myo-inositol

Vitamíny u rostlin slouží hlavně jako katalyzátory různých metabolických procesů, které jsou potřebné k růstu a vývoji. V *in vitro* kulturách přispívají k diferenciaci a růstu buněk a tkání. Rostliny jsou schopny samostatné syntézy potřebných vitamínů, avšak samotné kultury *in vitro* toho jsou schopny jen v malém a nedostačujícím množství. Nejčastěji média obsahují thiamin (B1), kyselinu nikotinovou a pyridoxin (B6). Pro růst všech buněk je nepostradatelný thiamin v koncentraci 0,1 až 10 mg/l. Přítomnost kyseliny nikotinové (0,1-5 mg/l) a pyridoxinu (0,1-10 mg/l) není pro růst kultury nezbytná. Dle typu média se přidávají i další vitamíny, jako je biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina panthotenová, tokoferol (vitamín E), riboflavin (B2) nebo kyselina p-aminobenzoová.

Myo-inositol je sacharid rozkládající se na kyselinu askorbovou a pektin, který se zabudovává do fosfoinositidů a fosfatidyl-inositolu. I v malém množství, obvykle v koncentraci 50-5000 mg/l, hraje klíčovou roli v buněčném dělení a stimulaci buněčného růstu.

Aminokyseliny

Obsah aminokyselin v buněčných a tkáňových kulturách je důležitým zdrojem organického dusíku. Organický dusík je rostlinami snadněji a rychleji využitelný oproti dusíku anorganickému. Vzhledem ke schopnosti kultur *in vitro* tvořit tyto aminokyseliny samy, není vhodné přidávat je samostatně, protože by mohly mít ve vyšších koncentracích opačný efekt, a to inhibovat buněčný růst. Přidávají se tedy ve formě směsi aminokyselin v koncentračním rozmezí od 1 do 100 mg/l, které je významné k

růstu buněk. Nejčastěji jsou jimi hydrolyzát kaseinu, L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin.

Nedefinované organické složky

Do určitých médií se přidávají organické látky nebo extrakty, které by mohly mít vliv na růst rostlin. Jde například o proteinové hydrolyzáty, kokosové mléko, extrakt z kvasnic, sladový extrakt, extrakt z banánu, pomerančovou nebo rajčatovou šťávu.

Někdy média bývají obohacena o aktivní uhlí, jehož účinek může být na některé explantáty příznivý (stimuluje růst a diferenciaci), na jiné zase nepříznivý (inhibuje buněčný růst). Nepříznivé sloučeniny produkované explantátem a růstové regulátory obsažené v médiu jsou aktivním uhlím absorbovány na svůj povrch.

Přidáním 1 % aktivního uhlí dochází během sterilizace v autoklávu ke zvýšené hydrolyze sacharózy a médium se stává kyselejší.

Látky zpevňující médium

Pro přípravu tuhých kultivačních médií je potřeba stabilních látek. Takové látky by měly vykazovat stálost za všech kultivačních teplot, nereagovat se složkami média a neměly by být rozkládány obsaženými enzymy. Nejčastěji se setkáme s agarem, univerzální gelující látkou získanou z mořských řas. Obsahuje vápník, hořčík a další stopové prvky, které jsou specifické pro konkrétní typ agaru. Jako gelující látky využíváme také agarózu a gellanovou gumu.

Regulátory růstu (35,38)

Regulátory růstu jsou nezbytné složky přidávané do živných půd, které stimulují proces růstu a vývoje v buněčné kultuře. Za přirozené růstové regulátory označujeme fytohormony – auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou, ethylen a další látky s regulační aktivitou. Účinek na růst je stimulační i inhibiční, a to v závislosti na

koncentraci látky a fyziologickém stavu rostliny. Exogenně jsou přidávány vždy v určitém poměru, kterým je určen rozsah organogeneze explantátové kultury.

Látky s růstově regulační aktivitou jsou účinné jen ve vyšších koncentracích. Jejich účinnost není dostatečně známa, a proto je jako hormony nenazýváme. Jde především o bassinosteroidy, polyaminy, kyselinu jasmonovou, oligosacharidy a fenolické látky.

a) Auxiny

Jedná se o indolové sloučeniny přidávané do kultivačních médií obvykle pro stimulaci růstu kalusu a buněk, mnohdy také k indukci zakořenění, embryogenezi a stimulaci růstu výhonků. Spolu s cytokininy jsou pro explantátové kultury podstatnou součástí pro regenerační procesy *in vitro*. Prvním objeveným přírodním auxinem se stala indolyl-3-octová kyselina (IAA), od které se postupně odvozovaly další syntetické analogy. Jejich fyziologická aktivita a metabolismus se u jednotlivých sloučenin může vzájemně lišit. Často také věnujeme pozornost kyselině indolyl-3-máselné (IBA), kyselině 4-chlor-indolyl-2-octové, kyselině α -naftyloctové (NAA) a kyselině 2,4-dichlorfenoxyoctové (2,4-D). Rozpuštěním auxinů v 95% ethylalkoholu nebo v malém množství 1N NaOH vznikají roztoky, které je vhodné uchovávat v chladničce při teplotě 4° C nebo mrazničce při -20 °C, kde vydrží po dobu několika měsíců.

b) Cytokininy

Cytokininy patří mezi hlavní stimulatory buněčného dělení v tkáňových kulturách. Jejich rozpustnost je nižší než u auxinů. Rozpouštění může být usnadněno přidáním 1N HCl, 1N NaOH nebo malého množství dimethylsulfoxidu (DMSO), aniž by tyto látky poškozovaly rostlinnou tkáň. DMSO má navíc povahu sterilizačního činidla, a proto je možné ho přidávat k již sterilním kultivačním médiím. Přítomnost cytokininů také působí vyšší odolnost rostlin vůči stresorům. Ke kulturám *in vitro* se běžně přidávají 6-benzyladenopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (2iP), 6-furfurylaminopurin (kinetin) a zeatin.

c) Gibereliny

Gibereliny zahrnují několik substancí navzájem se lišících v jejich aktivitě ve vztahu k růstu a vývoji. V porovnání s výše zmíněnými auxiny ovlivňují růst pouze v nadzemních částech rostliny – hlavně stonku. Nejčastěji se setkáme s kyselinou giberelovou (GA3).

d) Kyselina abscisová

Na rozdíl od ostatních růstových hormonů kyselina abscisová ovlivňuje růst především inhibicí v závislosti na rostlinném druhu. Dochází tedy k antagonistickému působení vůči účinkům auxinů a giberelinů.

3.4.2 Fyzikální podmínky kultivace

Pro úspěšný průběh kultivace jsou mimo složení kultivačního média nezbytné i fyzikální faktory, kterými simulujeme ideální prostředí pro růst explantátových kultur. Zahrnujeme sem teplotu, délku a intenzitu osvětlení, vlhkost a aciditu prostředí. Důležitými pro konkrétní druhy kultur jsou také zařízení jako je třepačka (využití u suspenzních kultur), termostat či inkubátor (32).

Teplota

Rozsah teplot by se měl pohybovat od 20 do 25 °C. Vyšší teploty mohou poškodit buňky, nižší teploty odpovídají za zpomalený růst i metabolismus.

Světlo

Světlo má velký význam především v ovlivňování enzymatické nebo genetické aktivity. Dostatečně osvětlené prostředí přispívá také ke zvýšené biosyntéze sekundárních metabolitů. Obvykle je vyžadováno osvětlení po dobu 16 hodin a následně 8 hodin tmy. Významnými faktory jsou i intenzita světla či jeho zdroj.

Vlhkost a acidita

Udávaná vlhkost v kulturách *in vitro* je mezi 80-90 %. pH prostředí bývá častokrát v závislosti na kultuře slabě kyselé, a to v rozmezí okolo 5,5-6. Je třeba pH přísně dodržovat dle odpovídajících předpisů pro jednotlivá živná média (31,32).

3.5 FYZIOLOGIE STRESU

Rostliny musí během svého života nepřetržitě vzdorovat různým nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Tyto vlivy označujeme za stresové faktory. Stres je stav, který nemá ustálenou povahu a popisuje se jako dynamický komplex mnoha reakcí. Pro rostlinu je nežádoucí z hlediska zpomalení jejich životních funkcí a poškození tkání a orgánů. Může způsobit i samotný úhyn rostliny (38).

Rostlinné buňky, tkáně i orgány mají různý regenerační potenciál. Během vývoje si vytvořili řadu obranných mechanismů k adaptaci na tyto změny. Tak úspěšně či neúspěšně mohou těmto stresovým podmínkám vzdorovat (39). Před vnějším prostředím se tak mohou chránit:

- **Pasivně** – Rostliny se před vnějšími vlivy, tedy stresory, chrání tvorbou struktur, které zamezují jejich průniku do rostlinného vnitřního prostoru. Z hlediska časového mají pro rostliny dlouhodobý charakter. Jejich ochrana spočívá například v tvorbě tlusté kutikuly na listech, impregnaci buněčných stěn, tvorbě rezervoárů vody apod.
- **Aktivně** – Aktivní ochrana spočívá v ovlivnění nežádoucího dopadu stresorů, které pronikly do rostlinných vnitřních struktur. Zde probíhá sled změn, který nazýváme stresovou reakcí (38).

Rostliny, jako přisedlé organismy, nikdy nejsou vystaveny jedné stresové reakci. Přirozeně jsou vystavovány působením alespoň dvěma faktorům, jako jsou kombinace sucha a slanosti, slanosti a tepla, sucha a vysokých teplot/vysoké intenzitě světla. Působení více stresorů na rostlinu je jedinečné a nelze ho přímo srovnávat s odpovědí

rostlin na každý stresový faktor zvlášť. Odezva rostlin je pak výsledkem působení různých signálních cest, které mohou být vzájemně protichůdné, mohou mezi sebou interagovat nebo se inhibovat (38).

Většinou je popisován především negativní vliv stresorů na růst a vývoj rostlin. Někdy je ale výsledek působení kombinace vlivů i pozitivní. Studie prokazují, že při vystavení suchu nebo ozonu docházelo ke zvýšené produkci ROS. Při kombinaci těchto dvou faktorů byly hladiny ROS v kontrolovaném stavu, neboť došlo k vyšší redukci askorbátu a glutathionu (40).

3.5.1 Průběh stresové reakce

Odpověď na stres se mezi jednotlivými rostlinnými druhy liší. Průběh stresové reakce lze ale shrnout do čtyř fází. V první fázi (tzv. poplachové) stresové reakce bývají poškozeny struktury buněk a tkání. To může vést i k narušení jejich funkcí. Druhá fáze (tzv. restituční) je důležitá pro ochranu rostliny, kdy se pohotově aktivují obranné mechanismy. Rostlina se následně ve třetí fázi (tzv. fázi rezistence) stává více odolnou pro stresové prostředí. Fáze čtvrtá (tzv. fáze vyčerpání) nastává při dlouhodobém vystavení stresovým podmínkám. Rostlina vyčerpává své kompenzační mechanismy, a tak dochází ke snížení odolnosti a následnému poškození (38).

3.6 OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ

METODOU ELICITACE

Jako sekundární metabolity (SM) označujeme rozličné sloučeniny, které jsou produkovány rostlinami, ale do procesu růstu a vývoje nejsou přímo zahrnuty. Mají pro rostlinu klíčovou funkci v zapojení se do procesu signalizace a obranné stresové reakce. Velká část těchto látek nachází využití jako fytoterapeutika, agrochemikálie, barviva, biopesticidy či potravinářské přídatné látky.

Chemická struktura těchto aktivních látek je často velmi složitá, a tím stěžuje samotnou chemickou syntézu (1,39,41). Hladiny sekundárních metabolitů se mění v

závislosti na podmínkách, kterým je rostlina vystavena. Kvůli jejich přirozené variabilitě nelze tyto hladiny reprodukovat. Avšak zjistilo se, že můžeme indukovat enzymatické dráhy sekundárního metabolismu (42). Mnoho z nich se syntetizuje z primárních metabolitů akumulovaných v buňkách rostlin a tato produkce může být právě ovlivněna podmínkami *in vitro* za účelem získání těchto aktivních látek (41).

3.6.1 Elicitace

Elicitace je proces, při kterém vyvoláváme stresovou reakci v rostlinách. Vlivem působení stresorů (elictorů) dochází v rostlině k indukci obranného mechanismu, který spočívá ve zvýšené biosyntéze sekundárních metabolitů a jejich akumulaci (39,43).

In vitro můžeme kultivovat a následně elicitovat rostlinné orgány, buněčné a tkáňové kultury (kalusy) nebo lze masivně rozmnožovat celé rostliny metodou mikropropagace. Kalus, jako neorganizovanou hmotu, můžeme vlivem vnějších podmínek záměrně zvětšovat právě pro produkci SM (41).

3.6.2 Elicitory

Elicitory rozdělujeme dle struktury na fyzikální a chemické nebo podle původu na abiotické a biotické (43). Mezi abiotické faktory řadíme vlivy fyzikální, jako jsou změny teploty, světla, vlhkosti a osmotický stres. Chemické vlivy zahrnují nedostatek živin, vody, kyslíku, nadbytek solí nebo také organické a toxické látky v půdě (těžké kovy) a vzduchu. Biotické faktory jsou odvozeny od živého organismu a mohou jimi být patogeny (bakterie, houby, viry), hmyz, býložravci poškozující rostliny spásáním nebo parazité (1,38,39).

3.6.2.1 Abiotické elicitory

Teplota

Výkyvy teplot mají za následek především změny v expresi genů působících na metabolické procesy související s produkcí sekundárních metabolitů (39). Značně zranitelné jsou rostliny při vystavení velmi nízkým teplotám, zpravidla pod bod mrazu.

Rostliny tvoří v extracelulárním prostoru led, vlivem kterého dochází k dehydrataci. V závislosti na druhu rostliny se tyto podmínky snažíme upravit. Za vyšších teplot byl pozorován nárůst v produkci ginsenosidů u kultury *Panax ginseng*. Naproti tomu buněčná kultura *Melastoma malabathricum* vykazovala vyšší aktivitu za nižších teplot (44).

Světlo

Významnou stimulací pro tvorbu sekundárně aktivních látek je sluneční záření (UV) a jeho délka trvání. Například u kalusové kultury *Zingiber officinale* došlo ke zvýšené akumulaci metabolitů gingerolu a zingiberenu. Součástí světla je také UV-B záření, které je vysoce energetické a jeho nadbytek může vést až k zastavení růstu, snížení produkce biomasy nebo potlačení fotosyntézy. Zajímavostí ale je, že působením UV-B světla na rostlinu *Catharanthus roseus* docházelo ke vzestupu koncentrace vinblastinu a vinkristinu, které jsou účinné v léčbě leukémie nebo lymfomu (1,39,44).

Sucho

Se stresem ze sucha se potýkají všechny druhy rostlin, avšak každý druh tento stres toleruje jiným způsobem. Mimo jiné, suchost rostliny může být také způsobena nadbytkem slunečního záření nebo působením vysokých teplot, kdy dochází ke snižování obsahu vody v rostlině až k jejímu úplnému nedostatku. Za deficit označujeme nedostatek vody, který už nepostačuje pro zásobení rostliny a tím i udržení jejich základních fyziologických funkcí, jako je růst, fotosyntéza a transpirace. Ačkoliv je omezen růst rostlin, hladina sekundárních metabolitů se zvyšuje (1,39,44).

Zasolené půdy

Zasolení půd má podstatný vliv na fyziologické a metabolické funkce rostliny a výrazně souvisí s indukcí sekundárně metabolických drah a vznikem zásob bioaktivních sloučenin, jako jsou fenoly, terpeny a alkaloidy. Bylo zjištěno, že v přítomnosti různých zdrojů dusíku docházelo v listech *Camptotheca acuminata* k vyšší syntéze kamptotecinu. Tento stres může být podpořen suchem, kdy vlivem osmotických dějů dochází ke

kumulaci solí ve vyšších částech rostliny. Kvůli hromadění solí ve vyšších hladinách a zároveň i půdě má rostlina nižší schopnost absorbovat vodu kořeny, a tak dochází ke ztrátám vody i z ní samotné. Dehydratace rostliny vede následně k osmotickému stresu (1,39,45).

Osmotický stres

Osmotický stres je vyvolán působením osmolytů. Tyto látky ovlivňují nejen produkci více biologicky aktivních látek, ale pozměňují také fyziologické a biochemické pochody v rostlině. Vodní stres působí prolin, polyethylenglykol (PEG) a sacharóza. Například u kultury *Hypericum perforatum* byla prokázána rozdílná biosyntéza látek hypericinu a hyperforinu. Obsahová hladina hyperforinu byla vysoká, zatímco hladiny hypericinu se významně snížily (1).

Těžké kovy

Těžké kovy činí zásadní roli ve vyvolání abiotického stresu. Především ionty niklu, stříbra, železa a kobaltu nejčastěji způsobují změny v metabolických procesech rostlin. To mimo jiné může ovlivnit produkci cukrů, proteinů a fotosyntetických pigmentů. Neméně vhodným elicitorem je také měď, u jejíž iontů bylo pozorováno v kultuře *Beta vulgaris* navýšení hladin betalainů (1,45).

Ozon

Ozon, tvořící se v horních vrstvách znečištěného vzduchu působením slunečního záření, může ohrožovat rostliny ležící především ve vyšších nadmořských výškách. Při prostupu ozonu do vnitřních struktur rostliny se následně přeměňuje za vzniku volných kyslíkových radikálů. Pomocí ochranných mechanismů rostlina produkuje ethylen, polyaminy a flavonoidy. Ve vyšších koncentracích tyto antioxidační systémy nepostačují (38).

3.6.2.2 Biotické elicitory

Původ biotických elicitorů vychází ze samotné rostliny nebo patogenních mikroorganismů. Jsou sem zahrnuty různé fragmenty, jako např. fragmenty buněčných stěn rostlin a chemické látky, které se stávají dostupnými při napadení rostlin jejich uvolněním. Ovlivňují řadu enzymatických pochodů v těle rostliny, ať už aktivací nebo inhibicí enzymů a také působí na iontové kanály. Biotické faktory mající vliv na produkci biologicky aktivních látek rozdělujeme na:

- **Proteiny:** celulóza, glykoproteiny, lektiny, aglutininy
- **Sacharidy:** chitin, chitosan, oligogalakturonidy
- **Rhizobakterie:** *Pseudomonas putida*, *Azospirillum fluorescens*, *Allorhizobium*
- **Houby:** *Trichoderma*, *Phytophthora*, *Protomyces*, *Fusarium*, *Claviceps*
- **Hormony:** auxiny, kyselina abscisová, ethylen, kyselina giberellová, kyselina salicylová, methyljasmonát, kyselina jasmonová (45)

Proteiny

Významnými jsou glykoproteiny, které v rostlinné kultuře navozují tvorbu obranných látek – fytoalexinů (sekundárních metabolitů). Bílkoviny lektin a aglutinin zastávají ochrannou funkci před různými organismy živícími se rostlinou. Jejich schopností je navázat na sebe sacharidové složky těchto patogenů a vyvolat tak obrannou reakci, která koresponduje s produkcí SM (45).

Sacharidy

Sacharidy mnoha typů vyvolávají významnou nadprodukcí sekundárních sloučenin. Složka buněčných stěn hub, chitin, je označována za účinný elicitor u několika druhů rostlin (45).

Rhizobakterie

Rhizobakterie jsou označovány pro svou kolonizaci v oblasti kořenů, tzv. rhizosféře. V příznivých i nepříznivých podmínkách zvyšují růst rostlin tak, že zvětšují

povrch kořenů a tvoří je více špičatými. Při vystavení rostliny tomuto elicitoru dochází k obranným reakcím a kumulaci sekundárních látek. Je prokázáno, že rhizobakterie jsou nejpříznivějšími biotickými elicitory, které jsou schopny indukovat klíčové enzymy sekundárního metabolismu (45).

Houby

Původ těchto biologických stresorů je odvozen od mykorhizních hub. Zjistilo se, že jsou velmi účinné v navození obranných mechanismů při napadení kořenů rostlin různými patogeny. Rostlina na elicitor reaguje přechodnou produkcí ROS, které pomocí enzymatických i neenzymatických systému účinně odbourává. Enzym fenylalanin amoniak-lyáza má klíčovou roli v nárůstu produkce SM jako antioxidantních systémů. Dnes se velmi často pro jejich vysokou účinnost používají k biosyntéze flavonoidů a fenylypropanoidů (1,45).

Hormony

Hormony, jako druzí poslové, jsou významné v indukci syntézy SM. Funkce hormonů spočívá v komunikaci s cílovými tkáněmi a rychlé reakci na vyvolané změny. Kyselina jasmonová působí jako důležitá signální molekula při vystavení rostliny patogennímu stresu. Tak může indukovat např. produkci kyseliny rozmarinové v rostlině *Mentha piperita*. Kyselina salicylová je známá pro svou získanou systémovou rezistenci vůči mnoha patogenům napadající rostliny. Tuto vlastnost využívá k indukci obranných mechanismů a navození syntézy SM (1,45).

Herbivorní živočichové

Býložravci spásáním poškozují rostlinné tkáně i celé orgány. Díky vysoké regenerační schopnosti ale umí rostliny tomuto stresu částečně odolávat. Adaptovali se po morfologické stránce, tak i po stránce metabolické. V obranné reakci produkují ve zvýšené míře biologicky aktivní sloučeniny, které na živočichy působí odpudivě, někdy až toxicky (38).

3.6.3 Faktory ovlivňující elicitaci

Produkce sekundárních metabolitů metodou elicitace je závislá na řadě faktorů, které je třeba zohlednit. Optimální působení elicitoru je podmíněno:

- Specifitou elicitoru
- Koncentrací elicitoru
- Dobou expozice elicitoru
- Podmínkami kultivace
- Stářím a druhem rostlinné kultury
- Stádiem růstu
- Přítomností a složením živin

Pod specifitou elicitoru si představujeme konkrétní typ elicitoru, který má vliv na aktivaci sekundárního metabolismu u různých druhů rostlin, naproti tomu každý rostlinný druh může vykazovat odlišnou aktivitu vůči různým typům elicitorů (46). Koncentrace je velmi podstatná k vyvolání požadovaného účinku. Ke kulturám *in vitro* postačuje stopové množství elicitoru, zatímco použití vysoké koncentrace častokrát vede k buněčné smrti. Doba expozice bývá odlišná u různých stresorů. Efekt může nastat v řádu hodin či dnů, odběr se proto nejčastěji provádí po 12, 24, 48 nebo 72 hodinách. Rozsah produkce biologicky aktivních sloučenin se také významně pojí se stářím rostlinné kultury (1,47).

3.6.4 Mechanismy elicitace

Regulace sekundárního metabolismu rostlin působením jednotlivých elicitorů probíhá na subcelulární úrovni. Výzkum těchto mechanismů je proto poměrně obtížný a dodnes není jasné, k jakým procesům přesně dochází. Metabolické a biochemické principy hrají hlavní roli v chápání stresové a obranné reakce biomasy na produkci sekundárně aktivních sloučenin (38,39). Zahrnujeme sem mechanismy ovlivňující membránové receptory a intracelulární signalizaci. Existuje hypotéza o narušení propustnosti cytoplazmatické membrány, změnách osmotického prostředí, nebo

ovlivnění membránového potenciálu ve směru hyperpolarizace nebo depolarizace. Při elicitaci dochází k aktivaci signální kaskády, která je specifická pro různé elicitory. Jednotlivé elicitory pak mohou ovlivňovat i více regulačních drah. Předpokládá se vliv těchto mechanismů:

- Vazba na membránový receptor
- Aktivace G-proteinu a následná stimulace adenylcyklázy a fosfolipázy C
- Zvýšené uvolňování druhých posílů (cAMP, DAG, IP3), fosforylace proteinů a aktivace cílových proteinkináz
- Zvýšený transport Ca^{2+} iontů z extracelulárního do intracelulárního prostoru
- Snížení pH cytoplazmy inhibicí H^+ -ATPázy
- Produkce ROS – hlavně superoxidového aniontu a H_2O_2 jako sekundárních posílů v transkripci genů pro obranný mechanismus

Nejčastěji diskutovaným mechanismem především v odpovědi na patogenní mikroorganismy je stimulace transmembránového receptoru. Následná aktivace G-proteinu u rostlin vykazuje podobnou aktivitu jako G-protein jiných organismů. Stojí za procesem růstu, vývoje, hormonální signalizace a obrannými reakcemi. Vlivem druhých posílů (cAMP) dochází k aktivaci proteinkináz. Zajímavostí je, že rostlina obsahuje nižší hladiny cAMP oproti zvířatům a potenciálně vhodnými elicitory by pak mohly být látky, které by dokázaly tuto hladinu navýšit (46,48).

Bylo zjištěno, že produkci sekundárních metabolitů rostliny lépe zvládají reakce na oxidační stres. Na antioxidačních a antiradikálových účincích se podílí přítomnost hydroxylových ale i thiolových skupin v jednotlivých sloučeninách. Když vystavíme rostlinné buňky stresovým podmínkám biotickým, abiotickým nebo jejich kombinaci, dochází vlivem chemické reakce k výměně mezi uhlíky a biosyntéze obranných sekundárních metabolitů. Tím jsou rostliny schopny dosáhnout stavu homeostázy nezbytného pro růst ve stresových podmínkách *in vitro* a *in vivo* (38,39).

3.7 PYRIDINY

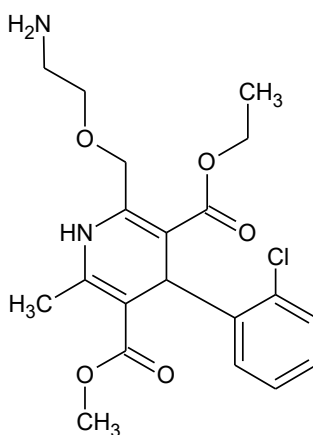
Pyridin je planární sloučenina, kterou zařazujeme do skupiny dusíkatých heterocyklů. Systematicky je také nazýván jako azabenzen či azin. Jeho struktura se skládá z šestičlenného aromatického kruhu, kde je jedna skupina -CH nahrazena jedním atomem dusíku. Má charakter polární sloučeniny a jako slabá base se snadno ionizuje. Dobře se rozpouští ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech (49,50).

Strukturu pyridinu nalezneme u mnoha přírodních látek, jako např. nikotinu či nukleových kyselin. Obvykle se tvoří při přeměně biologických látek či jejich rozpadu. Toxický alkaloid nikotin se ve velké míře syntetizuje a akumuluje v listech rostliny *Nicotiana tabacum* L. v reakci na vystavení abiotickým nebo biotickým faktorům. Biosyntetickou cestou vzniká z kyseliny jasmonové a tvoří většinu z celkových alkaloidů rostliny. Hladina nikotinu je velmi nízká, pokud stresové faktory působící na rostlinu chybí (49,51).

Polycyklické molekuly obsahující ve své struktuře dusík vykazují mnoho biologických účinků. Pyridin je účinným rozpouštědlem, využívá se pro aromatizaci potravin, jako barvivo, na výrobu lepidel, nebo je součástí insekticidních a herbicidních přípravků. Je popsáno velké množství farmakologicky aktivních látek, které byly právě objeveny při zavedení molekuly pyridinu do již známých struktur. Takto vznikly např. některá antihypertenziva, protizánětlivé látky, antihistaminika, sedativa, antituberkulotika či antivirotika (49,50).

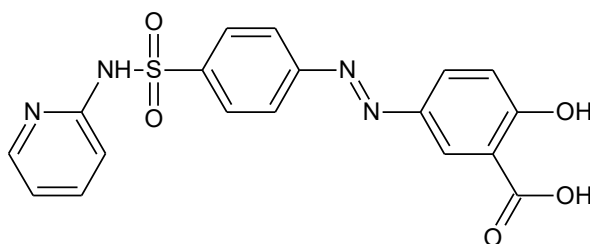
Příklady léčiv obsahující molekulu pyridinu (49):

- **Amlodipin** je lékem 1. linie u pacientů s vysokým krevním tlakem a dalšími kardiovaskulárními potížemi.



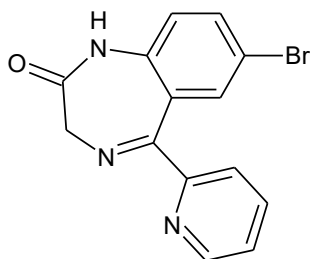
Obrázek 7: amlodipin

- **Sulfasalazin**, jako protizánětlivé léčivo, se využívá v terapii revmatoidní artritidy nebo Crohnovy nemoci.



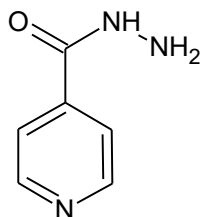
Obrázek 8: sulfasalazin

- **Bromazepam** má anxiolytické vlastnosti, působí sedativně až hypnoticky.



Obrázek 9: bromazepam

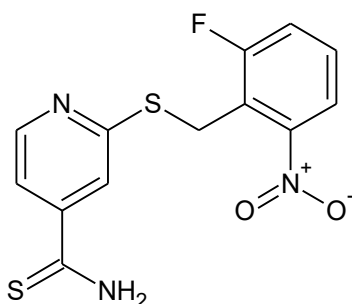
- **Isoniazid** je účinným v léčbě i prevenci tuberkulózy.



Obrázek 10: isoniazid

3.7.1 Deriváty pyridinu jako abiotické faktory

V explantátových kulturách *in vitro* byl testován vliv chemické substance alkylsulfanylderivátu pyridinu na aktivaci sekundárního metabolismu. Působením 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu na suspenzní kulturu *Trifolium pratense* docházelo k přepisu genů ovlivňující fenylpropanový metabolismus rostliny. Výsledkem byla účinná elicitace, která vedla k syntéze flavonoidů a isoflavonoidů (52).

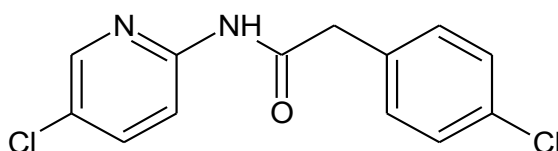


Obrázek 11: 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid (52)

3.7.2 2-(4-chlorfenyl)-N-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid

Chemická substance systematického názvu 2-(4-chlorfenyl)-N-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid byla součástí pokusu v experimentální části mé diplomové práce. Jako potenciální elicitor byla přidávána ke kalusové a suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. Sloučenina vznikla jako produkt chemické syntézy, kterou prováděl prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D. na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové. Známe o ní tyto vlastnosti:

- Molekulová hmotnost: 280,02
- LogP (lipofilita): 3,28
- ClogP: 3,57136



Obrázek 12: 2-(4-chlorfenyl)-N-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE

2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid, Katedra farmaceutické chemie a analýzy, FaF UK HK, ČR

Ajatin plus roztok 10%, Profarma – produkt s.r.o., ČR

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

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, ČR

Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR

Dusičnan draselný p.a., Lachema, ČR

Edetan sodný p.a., Sigma – Aldrich, USA

Ethanol 96%, čistý, Lachema, ČR

Glycin p.a., Penta, ČR

Hydrolyzát kaseinu, čistý, Imuna, Slovensko

Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lachema, ČR

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Penta, ČR

Jodid draselný p.a., Penta, ČR

Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR

Kyselina nikotinová, čistá, Sigma-Aldrich, USA

Kyselina fosforečná R p.a., Penta, ČR

Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR

Methanol p.a., Penta, ČR

Myo-inositol, čistý, Fluka, Švýcarsko

Pyridin, čistý, Sigma-Aldrich, USA

Pyridoxin, čistý, Sigma-Aldrich, USA

Růstový stimulant α -NAO, Sigma-Aldrich, USA

Sacharosa p.a., Lachema, ČR

Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR

Síran manganatý tetrahydrát p.a., Lachema, ČR

Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR

Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR
Standardy pro HPLC analýzu – hyperosid, Sigma-Aldrich, USA
Thiamin, čistý, Sigma-Aldrich, USA
Ultračistá voda, Katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR

4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Analytické váhy PRLT A13, Sartorius, Německo
Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR
Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko
Box s laminárním prouděním Fatran LF, Slovensko
Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko
Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko
Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko
Horkovzdušný sterilizátor, SVS 9/1, Chirana, ČR
Kolona LiChrospher RP-18e 250x4, sorbent Chrospher (5 µm), Merck, Německo
Mikrofiltry (0,20 µm), Corning NY 14831, Německo
Pipetovací balónek, Filip, Německo
Předkolona, Merck, Německo
Sušárna HS 61A, Chirana, ČR
Termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko
Těsnění na vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR
Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR
Vodní lázeň GFL, typ 1042
Třepačka KS 15 A Control, Edmund Bühler, Německo
Ultrazvuková lázeň, typ RX 255H Bandelin Sonorex, Německo

4.3 KULTIVACE *IN VITRO*

4.3.1 Kultura *Hypericum perforatum* L.

Na pokus byla použita kalusová a suspenzní kultura rostliny *Hypericum perforatum* L. pasáže č. 157-160.

4.3.2 Příprava kultivačního média

Suspenzní a kalusová kultura *Hypericum perforatum* L. byla kultivována v živném médiu Murashige a Skoog (MS) za přítomnosti růstového stimulantu kyseliny α -naftyloctové (α -NAO). V jeho složení se nachází především anorganické soli, vitamíny a aminokyseliny (36). Podrobně o tom pojednává tabulka 2. Obsah jednotlivých složek odpovídá mg/l.

Tabulka 2: Složení živného média (35).

MAKROELEMENTY	
NH ₄ NO ₃	1650,000
KNO ₃	1900,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000
MIKROELEMENTY	
KI	0,830
H ₃ BO ₃	6,200
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,500
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
ŽELEZNATÝ KOMPLEX	
Na ₂ EDTA	37,300
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800
VITAMÍNY	
Thiamin	0,100
Pyridoxin	0,500
Kyselina nikotinová	0,500
GLYCIN	
	2,000
MYO-INOSITOL	
	100,000
SACHARÓZA	
	30000,000
HYDROLYZÁT KASEINU	
	1000,000

Živné médium bylo připravováno do 1L odměrné baňky. Postupně byly přidávány předem nachystané zásobní roztoky těchto substancí:

- 100 ml makroelementů
- 10 ml železnatého komplexu
- 1 ml mikroelementů
- 1 ml glycinu
- 1 ml vitamínů
- 1 ml kyseliny α -naftyloctové

Veškeré složky byly smíchány a zředěny přibližně 500 ml destilované vody. Následně byly na analytických vahách odváženy pevné komponenty, které se v médiu nechaly rozpustit:

- 0,1000 g myo-inositolu
- 30,0 g sacharózy
- 1,000 g hydrolyzátu kaseinu

Médium bylo po rysku odměrné baňky doplněno destilovanou vodou a pečlivě promícháno. Kultivační médium bylo rovnoměrně rozděleno do 35 Erlenmeyerových baněk, ve kterých probíhal celý proces kultivace. Při kultivaci kalusových kultur byly použity můstky z filtračního papíru. Baňky s médiem se uzavřely hliníkovou fólií a nechaly se sterilizovat po dobu 20 minut při 121 °C a tlaku 100 kPa v autoklávu.

4.3.3 Příprava kalusových a suspenzních kultur

Přesazování kalusových a suspenzních kultur probíhalo za aseptických podmínek v předem vysvíceném laminárním boxu pomocí germicidní UV lampy. Připravené živné médium bylo rozlito do baněk. Baňky s médiem byly následně překryty hliníkovou fólií a nechaly se sterilizovat. Aby se zabránilo kontaminaci rostlinného materiálu při samotném přesazování, bylo nezbytné povrch všech baněk a hliníkových fólií očistit 96%

ethanolem. Přesazována byla vždy světlá narostlá kultura buněk (kalus) z dané pasáže. V laminárním boxu se za pomoci sterilní pinzety rozdělily kalusy do jednotlivých baněk s kultivačním médiem, umístily se na vytvořené můstky a opět se překryly hliníkovou folií. Následně se kalusová kultura kultivovala po dobu tří týdnů v kultivační místnosti za specifických podmínek, a to při teplotě 25 °C a střídání světla – 16 hodin a tmy – 8 hodin.

Příprava suspenzní kultury vycházela z kalusové kultury. To zahrnovalo předchozí kultivaci kalusové kultury po dobu tří až pěti týdnů. Jednotlivé kalusy byly přeneseny do živného média v Erlenmeyerově baňce, kde byly sterilní pinzetou mechanicky rozmělněny za vzniku suspenze. Baňky se překryly hliníkovou folií a uložily v kultivační místnosti do třepačky o 120 otáčkách za minutu. Takto vzniklá suspenze byla kultivována za stejných podmínek jako kultura kalusová.

4.4 ELICITACE

4.4.1 Postup přípravy elicitoru

Elicitace *in vitro* kalusových a suspenzních kultur *Hypericum perforatum* L. probíhala pod působením roztoku elicitoru 2-(4-chlorfenyl)-N-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamidu, který byl použit ve třech koncentracích 50mg/50ml, 5mg/50ml a 0,5mg/50ml. Roztok elicitoru byl připraven v 50 ml odměrné baňce za použití sterilního laboratorního skla a dalších pomůcek. Ke zředění jsme použili 96% ethanol.

$$C_1 = 50\text{mg}/50\text{ml} = 3,571 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$C_2 = 5\text{mg}/50\text{ml} = 3,571 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$C_3 = 0,5\text{mg}/50\text{ml} = 3,571 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Navážením 50 mg substance na analytických vahách, kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním ethanolem 96% na 50 ml, vznikl roztok o koncentraci C_1 (50mg/50ml).

Odměření 5 ml roztoku C_1 a zředěním 96% ethanolem po rysku, jsme následně získali roztok C_2 (5mg/50ml).

Koncentrace C_3 (0,5/50ml) byla připravena stejným způsobem odpipetováním 5 ml roztoku o koncentraci C_2 a doplněním rozpouštědla do 50 ml odměrné baňky.

4.4.2 Elicitace *in vitro*

Výzkum vlivu elicitoru na produkci flavonoidu hyperosidu se prováděl celkem na šesti pokusech. Na první tři pokusy byla použita kalusová kultura, na další tři kultura suspenzní. Ke každému pokusu bylo k dispozici 35 baněk, z nichž 10 sloužilo pro kontrolu. Pokus byl zahájen po třech týdnech kultivace.

Celý proces se prováděl v aseptických podmínkách daných působením UV záření za využití laminárního boxu. Do předem očištěných baněk ethanolem 96% byl sterilní pipetou odměřen 1 ml elicitoru o dané koncentraci a následně bylo hrdlo baňky překryto hliníkovou folií. K deseti zbylým baňkám se přidal 1 ml 96% ethanolu.

Po vnesení roztoku elicitoru se všechny baňky přemístily do kultivační místnosti o definovaných podmínkách, kde podléhaly po určitou dobu elicitaci. Suspenzní kultury byly po celou dobu udržovány na třepačce.

Kalusy i suspenze se pravidelně odebíraly po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách elicitace. Ke každému odběru sloužilo celkem 5 baněk. Kalus byl z baňky přenesen na filtrační papír a následně se sušil za laboratorní teploty. Suspenzní kultura byla přefiltrována přes Büchnerovu nálevku do odsávací baňky a zachycená tkáň se sušila na filtračním papíře za stejných podmínek jako kalusová kultura. Živné médium s obsahem elicitoru bylo odlito do označené zkumavky a následně zamraženo. Kontrolní baňky byly odebírány stejným způsobem vždy po 24 a 168 hodinách. Stejným způsobem se postupovalo u všech koncentrací roztoku elicitoru.

4.5 STANOVENÍ OBSAHU

4.5.1 Příprava vzorků k HPLC analýze

Pro stanovení obsahu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) musely být získány extrakty z kalusových a suspenzních kultur a jejich médií.

Z nasušených kalusů byl rozmělněním v třecí misce s tloučkem získán prášek, který se zvážil na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa a kvantitativně převedl do 50 ml varné baňky. Do každé baňky bylo odměřeno 10 ml 80% methanolu. Následně byla směs zahřívána na vodní lázni o 70 °C pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Extrakt byl poté zfiltrován přes malý kousek vaty do odměrné baňky o objemu 25 ml. Vata se zbytkem kalusu byla vrácena do varné baňky, do které bylo následně doplněno 10 ml methanolu a dalších 10 minut se nechala extrahovat. Obsah byl opět zfiltrován přes vatu a přidán k prvnímu filtrátu. Vzniklý extrakt byl doplněn po rysku methanolem a dobře promíchán. Následně bylo z odměrné baňky odebráno injekční stříkačkou 1,7 ml roztoku, který byl přes mikrobiální filtr (0,22 µm) převeden do řádně označených vialek. Ty se uchovávaly v lednici a byly tak připraveny pro HPLC analýzu. Kontrolní vzorky byly extrahovány a uchovávány stejným způsobem.

Živná média byla předem rozmrazena a odměřením 10 ml převedena do odpařovací misky. Na vodní lázni byla média odpařována při 100 °C do sucha. Odparky byly následně rozpuštěny v 10 ml methanolu 80% za občasného promíchání. Roztok byl po 10 minutách zfiltrován přes vatu a pomocí injekční stříkačky bylo odebráno 1,7 ml přes mikrobiální filtr do vialky. Vialky byly umístěny do lednice.

4.5.2 Metoda HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je dnes široce využívanou separační analytickou metodou především v odvětví farmaceutického průmyslu, klinické chemie nebo biochemie. Její význam spočívá v kvalitativním a kvantitativním hodnocení izolovaných složek směsi, a to bez ohledu na strukturální rozmanitost těchto látek (např. přírodních látek).

Principem této metody je rozdělení složek směsi mezi dvě nemísitelné fáze – tzv. stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Při prostupu mobilní fáze (eluentu) směsí se na základě fyzikálně-chemických vlastností různou rychlostí separují jednotlivé složky. Kvalitativní charakteristikou je tzv. retenční čas (t_R) značící dobu od nástřiku po oddělení píku dané složky od směsi. Kvantitativně hodnotíme plochu pod píkem, případně i jeho výšku (53).

4.5.3 Vlastní HPLC analýza

Pro stanovení obsahu sekundárního metabolitu hyperosidu byla využita metoda HPLC. Analýza se prováděla na chromatografické sestavě Jasco – čerpadlo Jasco PU-2089, autosampler AS-2055, termostat Jetstream 2 Plus, kolona LiChrospher RP-18e 250x4 5 μ m (reverzní fáze C18 oktadecylsilyovaný silikagel se stíněnými silanolovými skupinami), detektor MD-2015.

Parametry analýzy hyperosidu:

- Gradientová eluce, 24 minut
- Mobilní fáze A (eluent A): směs objemových dílů acetonitrilu a 0,15% kyseliny fosforečné (5+95)
- Mobilní fáze B (eluent B): 100% acetonitril
- Rychlost průtoku: 1,0 ml/min
- Teplota kolony: 25 °C
- Nástřik: 50 μ l
- Detekce: spektrofotometrický detektor, 254 nm

Tabulka 3: Složení mobilní fáze v průběhu eluce.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%V/V)	Mobilní fáze B (%V/V)
0-21	85 → 15	15 → 85
21-24	15	85
24-24,5	15 → 85	85 → 15
24,5-32	85	15

Obsah sekundárního metabolitu byl stanoven pomocí matematické metody normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou.

Kalibrační křivka

Kalibrační graf byl použit pouze k hodnocení linearity. Vzhledem k nízkým plochám ve vzorcích byly koncentrace hyperosidu počítány metodou vnějšího standardu. Jako kalibrační roztok byl použit methanol 0,1 µg/ml. Kalibrační křivka byla sestrojena na základě rovnice: $y = bx + a$

y – plocha píku hyperosidu

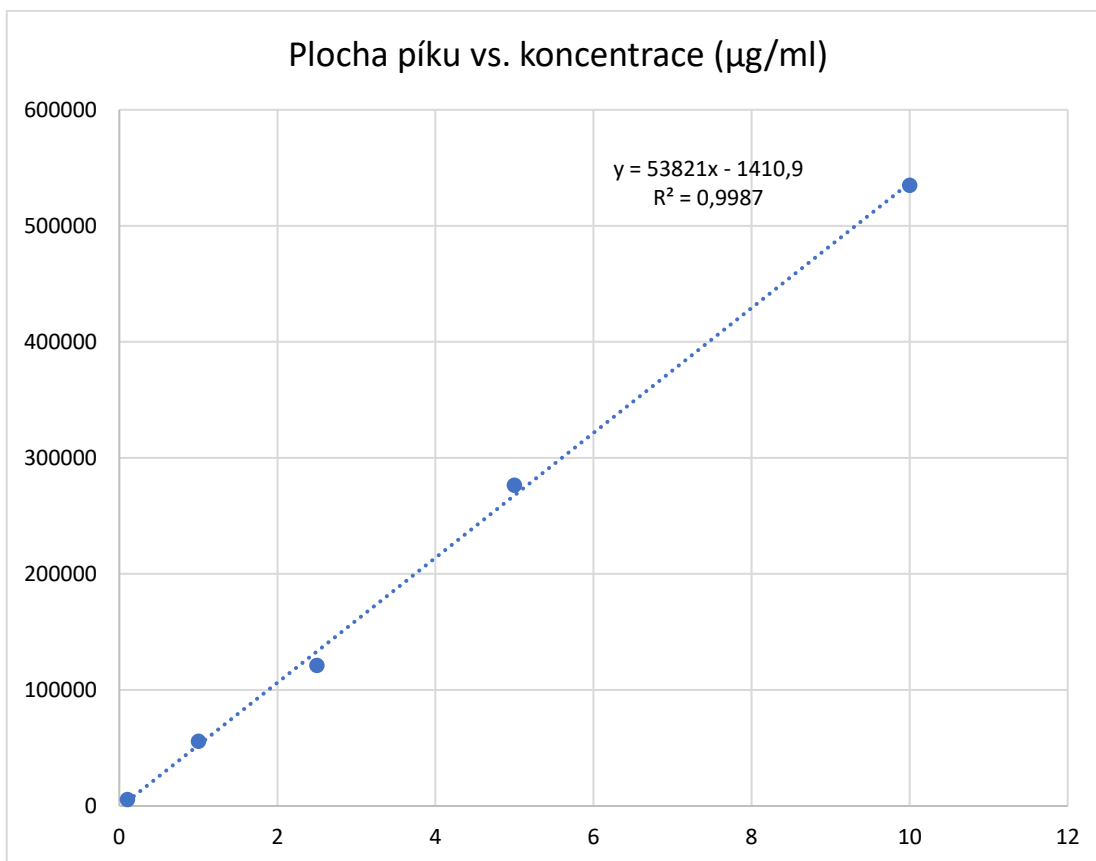
x – koncentrace v µg/ml

a = 0

b – obsah hyperosidu

R² – hodnota spolehlivosti

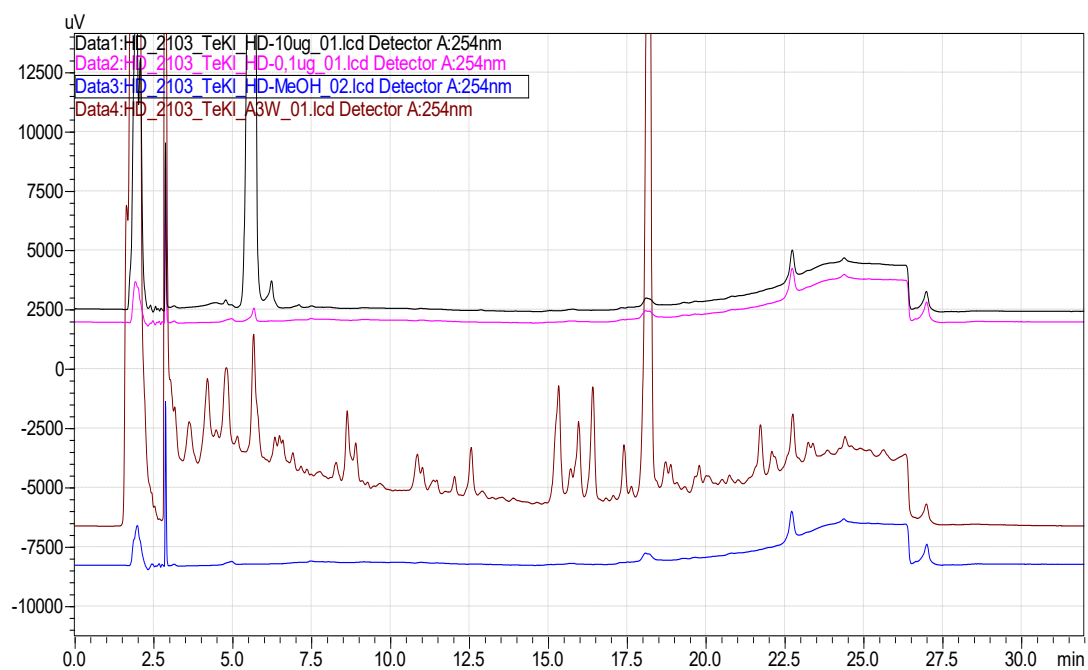
Graf 1: Kalibrační křivka pro hyperosid.



Chromatogram standardu a vzorku hyperosidu

Retenční čas standardu hyperosidu činil 5,7 minut. Od shora dolů nacházíme chromatogramy:

- Hyperosid 10 µg/ml v MeOHS (standard)
- Hyperosid 0,1 µg/ml v MeOH (porovnávací roztok)
- Vzorek odebraný po 48 hodinách působení elicitoru C₁ ($3,571 \cdot 10^{-3}$ mol/l) na kalusovou kulturu (0,945 µg/g DW)
- Blank (kontrola) = MeOH



Obrázek 13: Chromatogram standardu hyperosidu a stanovovaného vzorku.

4.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je statistická funkce, která vyjadřuje míru odchýlení naměřených hodnot od hodnoty průměrné (střední). Je pro ni charakteristický tento vztah:

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

s – směrodatná odchylka

x – hodnota sledované veličiny

\bar{x} – průměrná hodnota sledované veličiny

n – počet členů souboru

T – test

Testovací kritérium vymezuje statistickou významnost vlivu elicitoru na rozsah produkce sekundárního metabolitu hyperosidu. Je stanoven z rozdílu dvou středních hodnot, a to obvykle zkoušené a kontrolní hodnoty. T – test je vyjádřen vztahem:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \times \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

t – testovací kritérium

x_1 – aritmetický průměr kontrolního souboru

x_2 – aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 – směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 – směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 – počet členů kontrolního souboru

n_2 – počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu náleží t-rozdělení se stupněm volnosti. Vyjadřujeme jej tímto vztahem:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Výsledná hodnota testovacího kritéria je srovnána s tzv. kritickou hodnotou **t(v)p** pro vypočítaný stupeň volnosti **v** a vybranou hladinu významnosti **p**. Je-li hodnota **t** oproti hodnotě **t(v)p** vyšší, považuje se tento rozdíl za statisticky významný.

Analýza obsahu hyperosidu v kulturách byla prováděna ze třech paralelních stanovení, kde počet členů v souboru odpovídal **n₁ = n₂ = 3** s celkovým počtem stupňů volnosti **v = 4**. Pro zvolenou hladinu významnosti **p = 0,05** a počet stupňů volnosti **v = 4** činí hodnota testovacího kritéria **t(v)p = 2,78**.

Testovací kritérium bylo stanoveno z hodnot pokusného souboru získaných po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách odběru za využití kontrolních hodnot v čase odběru 24 a 168 hodin.

5 VÝSLEDKY

5.1 TABULKY

Tabulka 4: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/g DW}$) v **kalusové kultuře** *Hypericum perforatum L.* po působení roztoku elicitoru ve třech koncentracích.

Koncentrace elicitoru	Čas odběru (hod.)	Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/g DW}$)	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
C₁ 50mg/50ml	6	nedetekováno	---	---
	24	0,017	0,002	3,500
	48	0,945	0,098	13,492
	72	0,055	0,011	5,762
	168	0,036	0,003	11,628
C₂ 5mg/50ml	6	< 0,01	0,001	0
	24	0,021	0,004	3,479
	48	0,053	0,013	4,664
	72	< 0,01	0,003	0
	168	0,015	0,001	5,000
C₃ 0,5mg/50ml	6	0,125	0,021	7,710
	24	0,181	0,035	6,898
	48	0,132	0,032	5,389
	72	0,177	0,057	4,143
	168	0,182	0,066	3,686
KONTROLA	24	< 0,01	0,002	---
	168	< 0,01	0,001	---

Tabulka 5: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/ml}$) v živném médiu kalusových kultur *Hypericum perforatum* L. po působení roztoku elicitoru ve třech koncentracích.

Koncentrace elicitoru	Čas odběru (hod.)	Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/ml}$)	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
C₁ 50mg/50ml	6	0,055	0,009	7,028
	24	0,322	0,092	4,796
	48	0,195	0,059	4,434
	72	0,132	0,065	2,654
	168	0,509	0,113	6,245
C₂ 5mg/50ml	6	< 0,01	0,003	0
	24	nedetekováno	---	---
	48	< 0,01	0,001	0
	72	< 0,01	0,001	0
	168	< 0,01	0,002	0
C₃ 0,5mg/50ml	6	< 0,01	0,001	0
	24	1,199	0,147	11,439
	48	0,860	0,128	9,391
	72	1,164	0,112	14,571
	168	0,453	0,062	10,103
KONTROLA	24	< 0,01	0,001	---
	168	< 0,01	0,001	---

Tabulka 6: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/g DW}$) v **suspenní kultuře** *Hypericum perforatum L.* po působení roztoku elicitoru ve třech koncentracích.

Koncentrace elicitoru	Čas odběru (hod.)	Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/g DW}$)	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
C₁ 50mg/50ml	6	nedetekováno	---	---
	24	nedetekováno	---	---
	48	nedetekováno	---	---
	72	nedetekováno	---	---
	168	nedetekováno	---	---
C₂ 5mg/50ml	6	< 0,01	0,003	0
	24	< 0,01	0,002	0
	48	nedetekováno	---	---
	72	nedetekováno	---	---
	168	nedetekováno	---	---
C₃ 0,5mg/50ml	6	17,7	1,580	15,834
	24	nedetekováno	---	---
	48	3,69	0,320	16,308
	72	nedetekováno	---	---
	168	nedetekováno	---	---
KONROLA	24	< 0,01	0,002	---
	168	nedetekováno	---	---

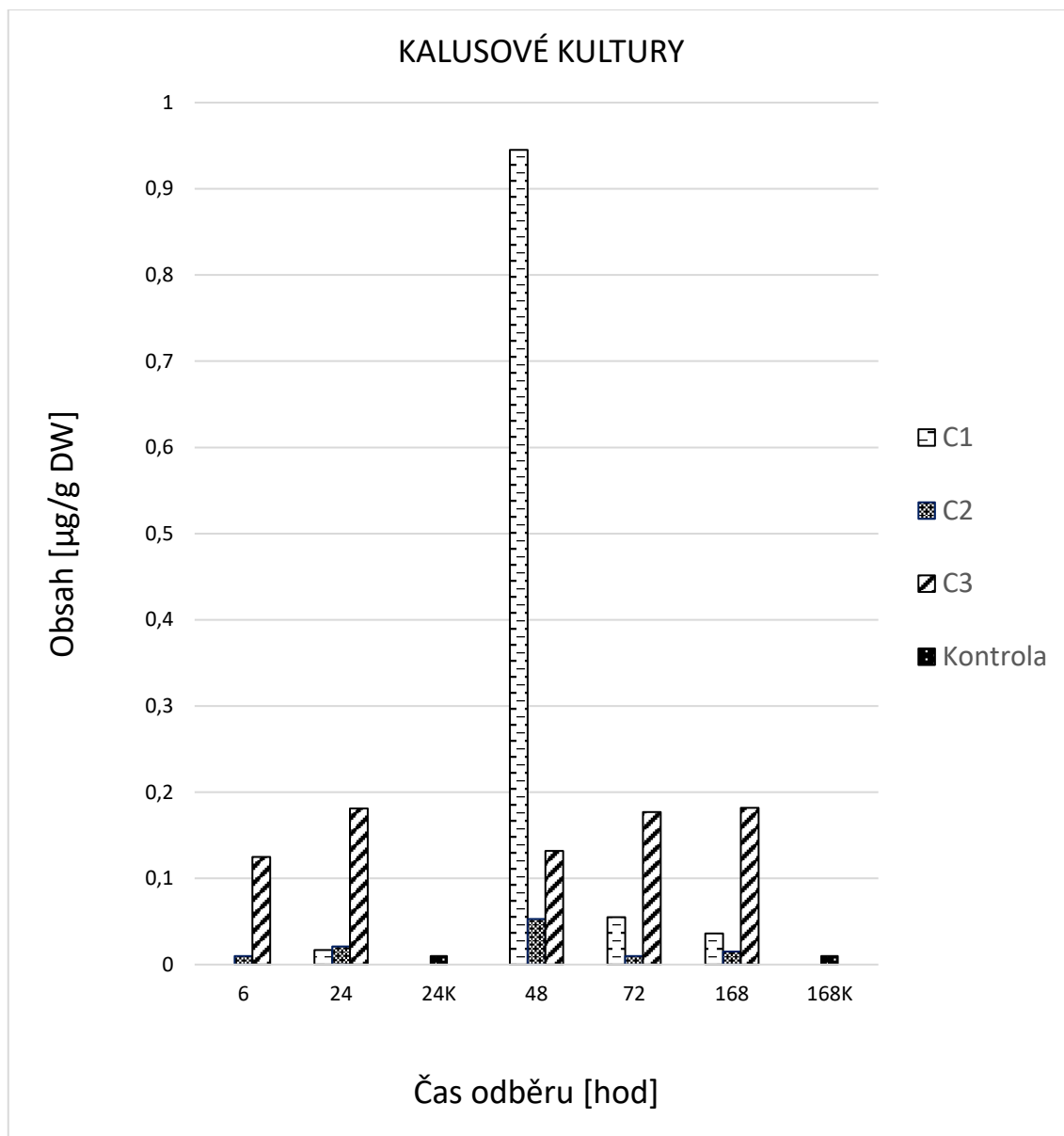
Tabulka 7: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/ml}$) v živném médiu suspenzních kultur *Hypericum perforatum* L. po působení roztoku elicitoru ve třech koncentracích.

Koncentrace elicitoru	Čas odběru (hod.)	Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/ml}$)	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
C₁ 50mg/50ml	6	< 0,01	0,002	---
	24	nedetekováno	---	---
	48	< 0,01	0,001	---
	72	0,014	0,004	1,265
	168	0,022	0,003	4,708
C₂ 5mg/50ml	6	< 0,01	0,001	---
	24	0,031	0,003	0,271
	48	0,030	0,007	3,885
	72	0,039	0,012	3,371
	168	0,031	0,006	4,696
C₃ 0,5mg/50ml	6	nedetekováno	---	---
	24	nedetekováno	---	---
	48	nedetekováno	---	---
	72	nedetekováno	---	---
	168	nedetekováno	---	---
KONTROLA	24	0,033	0,010	---
	168	< 0,01	0,002	---

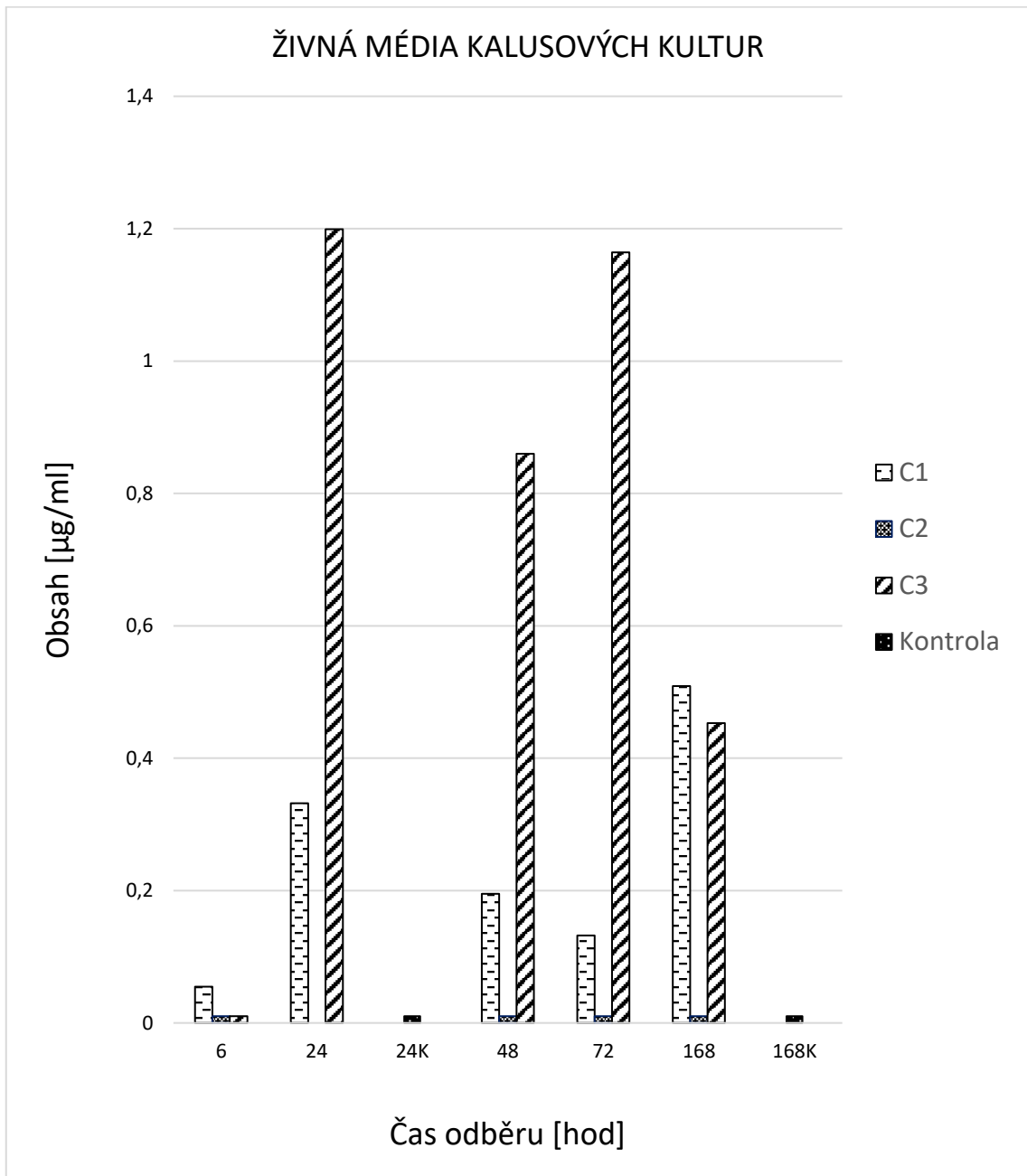
Označení „DW“ je anglickou zkratkou spojení „Dry Weight“ a představuje hmotnost sušiny. Tučně zvýrazněným písmem jsou vyznačeny statisticky významné hodnoty.

5.2 GRAFY

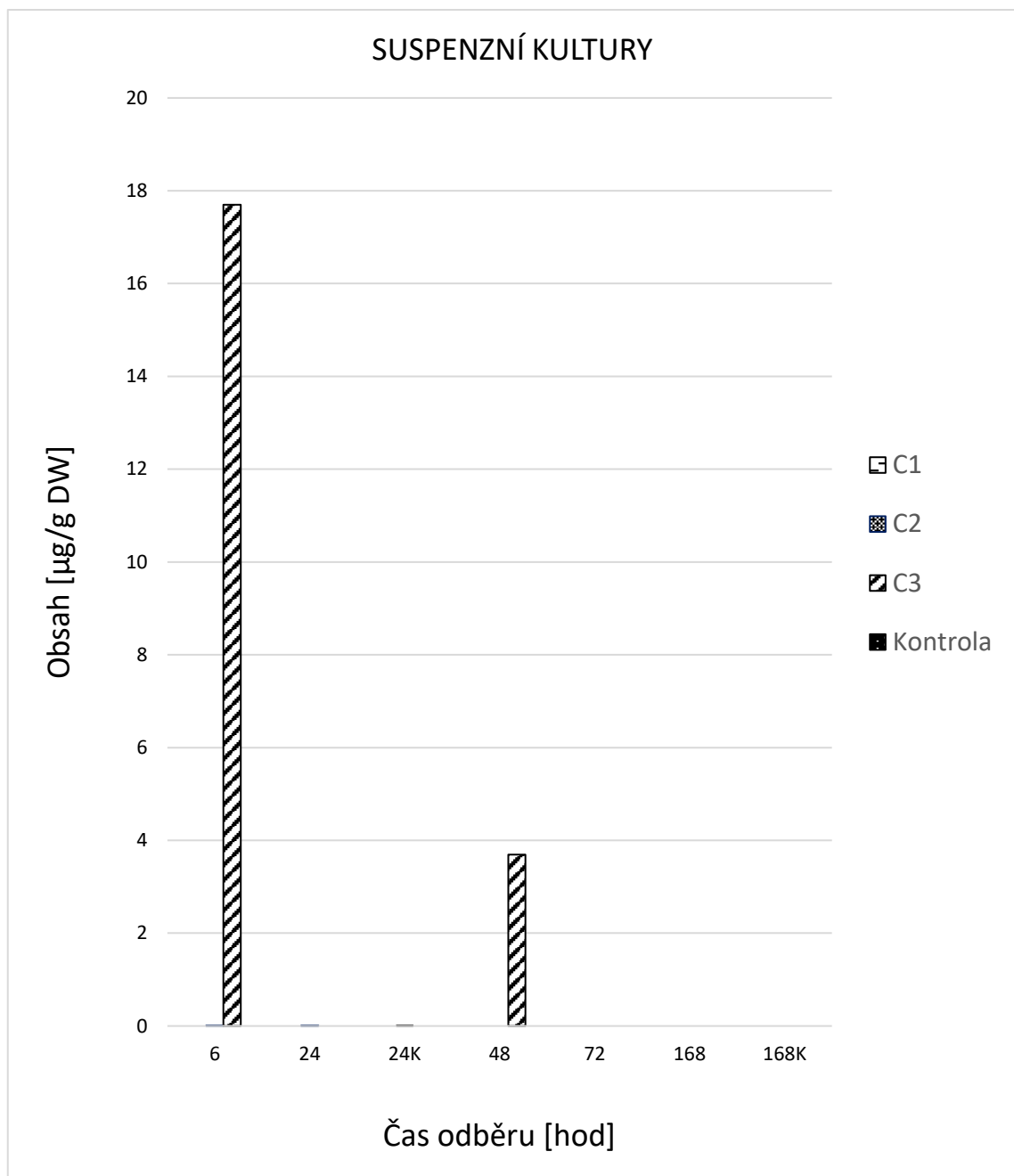
Graf 2: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/g DW}$) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* L. po působení roztoku elicitoru o koncentraci C_1 , C_2 a C_3 v závislosti na čase odběru.



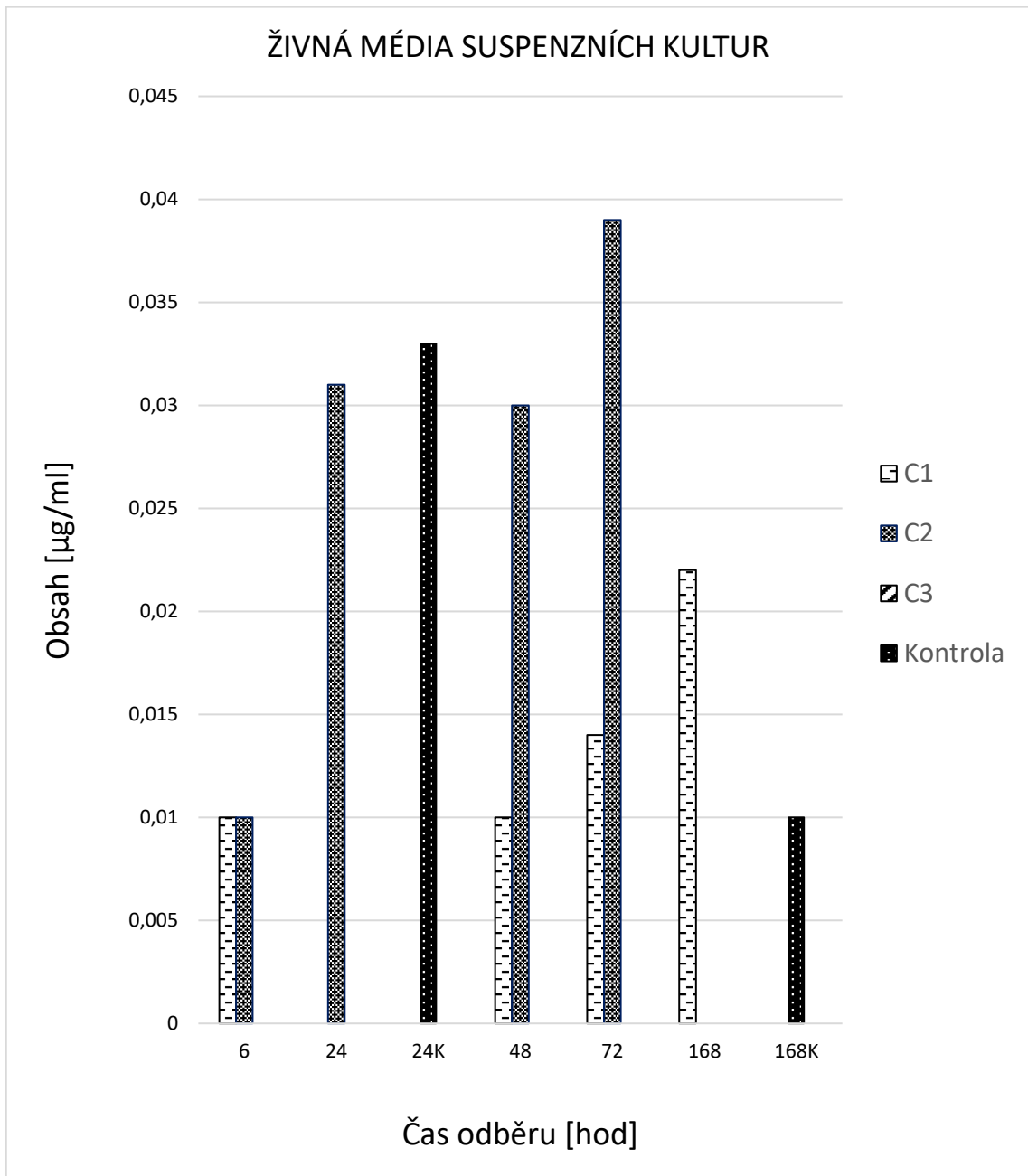
Graf 3: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/ml}$) v živném médiu kalusových kultur *Hypericum perforatum* L. po působení roztoku elicitoru o koncentraci C_1 , C_2 a C_3 v závislosti na čase odběru.



Graf 4: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/g DW}$) v **suspenní kultuře** *Hypericum perforatum* L. po působení roztoku elicitoru o koncentraci C_1 , C_2 a C_3 v závislosti na čase odběru.



Graf 5: Obsah hyperosidu ($\mu\text{g/ml}$) v živném médiu suspenzních kultur *Hypericum perforatum* L. po působení roztoku elicitoru o koncentraci C_1 , C_2 a C_3 v závislosti na čase odběru.



6 DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá studiem vlivu abiotického elicitoru 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamidu na produkci sekundárního metabolitu hyperosidu v kultuře *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. Pokus byl prováděn na kalusových a suspenzních kulturách získaných v pasáži č. 157-160. Součástí pokusu bylo seznámení se s metodou kultivace *in vitro* a následným procesem elicítace, který vedl k ovlivnění sekundárního metabolismu rostliny.

Pro kalusové a suspenzní kultury bylo vybráno kultivační médium Murashige a Skoog (35) a vhodný růstový stimulátor, kterým byla v našem případě kyselina α -naftyloctová (α -NAO) o koncentraci 1 mg/l. Kultivace probíhala při teplotě 25 °C v kultivační místnosti, kde byl střídán režim světla (16 hodin) a tmy (8 hodin). Suspenzní kultury vzniklé mechanickým rozmělněním kalusu byly umístěny na třepačce (120 otáček/min.) a uchovávány za stejných podmínek jako kultury kalusové.

Abiotický elicitor 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid byl přidáván ke kulturám ve 3 koncentracích:

$$C_1 = 50\text{mg}/50\text{ml} = 3,571 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$C_2 = 5\text{mg}/50\text{ml} = 3,571 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$C_3 = 0,5\text{mg}/50\text{ml} = 3,571 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Odběry jednotlivých vzorků byly vždy prováděny po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Současně byly odebírány v časech 24 a 168 hodin i kontrolní vzorky, ke kterým byl namísto elicitoru přidáván 96% ethanol.

Koncentrace sekundárního metabolitu hyperosidu v jednotlivých vzorcích byly stanoveny za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Výsledný obsah flavonoidu je uveden v tabulkách č. 4 - 7 a k nim odpovídajících grafech č. 2 - 5.

Kalusové kultury

Při vystavení kalusových kultur roztoku elicitoru o koncentraci C_1 ($3,571 \cdot 10^{-3}$ mol/l) byla v čase 24 (0,017 $\mu\text{g/g DW}$), 72 (0,055 $\mu\text{g/g DW}$) a 168 hodin (0,036 $\mu\text{g/g DW}$) pozorována mírně zvýšená produkce sekundárního metabolitu hyperosidu ve srovnání s kontrolními vzorky. Nejvýznamněji byla ovlivněna produkce po 48 hodinách, kdy hladiny hyperosidu vystoupaly na 0,945 $\mu\text{g/g DW}$ oproti kontrole ($< 0,01$ $\mu\text{g/g DW}$). U odběru po 6 hodinách nebyly hodnoty detekovány. (Tab. č. 4, Graf č. 2)

Koncentrace elicitoru C_2 ($3,571 \cdot 10^{-4}$ mol/l) neměla významnější vliv na zvýšení obsahu sledovaného sekundárního metabolitu oproti koncentraci C_1 . Nejvyšší obsah hyperosidu (0,053 $\mu\text{g/g DW}$) byl dosažen po 48 hodinách elicitace. Naproti tomu odběr po 6 a 72 hodinách nepřinesl žádný rozdíl oproti kontrole. (Tab. č. 4, Graf č. 2)

Statisticky významná produkce byla zaznamenána u koncentrace elicitoru C_3 ($3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l), kdy ve všech časech odběru bylo dosahováno relativně podobných výsledných hodnot. Nejvyšší produkce hyperosidu byla pozorována po 24 (0,181 $\mu\text{g/g DW}$) a 168 hodinách (0,182 $\mu\text{g/g DW}$) oproti kontrolnímu vzorku. (Tab. č. 4, Graf č. 2)

Živná média kalusových kultur

Při působení elicitoru o koncentraci C_1 a C_3 na kalusovou kulturu se zjistilo, že je hyperosid ve zvýšené míře uvolňován do jejího živného média. V obou případech se jedná o významný statistický rozdíl ve srovnání se samotnou kalusovou kulturou i kontrolou. Výjimkou, kdy byl obsah hyperosidu nižší oproti kalusu, byl odběr po 48 hodinách za přítomnosti elicitoru C_1 . Po 168 hodinách působení elicitoru C_1 byly z živného média získány hodnoty obsahu hyperosidu (0,509 $\mu\text{g/ml}$) o 14 % vyšší než z kalusu. U koncentrace elicitoru C_3 byla produkce statisticky nejvíce významná. Po 6 hodinách elicitace, kdy byl obsah hyperosidu srovnatelný s kontrolou ($< 0,01$ $\mu\text{g/ml}$), se během následného odběru po 24 hodinách hodnoty navýšily na 1,199 $\mu\text{g/ml}$, což je o 119,9 % významnější rozdíl. Naopak žádný statistický rozdíl v obsahu tohoto

sekundárního metabolitu oproti kontrole nebyl zaznamenán v živných médiích v přítomnosti elicitoru o koncentraci C_2 . (Tab. č. 5, Graf č. 3)

Suspenní kultury

Vliv elicitoru o koncentraci C_1 ($3,571 \cdot 10^{-3}$ mol/l) na suspenní kulturu neměl žádný vliv na produkci sekundárního metabolitu hyperosidu. Ve všech časech odběru byly hodnoty nedetekované. (Tab. č. 6, Graf č. 4)

Lepších výsledků nebylo dosaženo ani při působení elicitoru v koncentraci C_2 ($3,571 \cdot 10^{-4}$ mol/l). V čase 6 a 24 hodin byl obsah hyperosidu srovnatelný s kontrolou. V ostatních případech nebyla přítomnost tohoto sekundárního metabolitu detekována. (Tab. č. 6, Graf č. 4)

Statisticky významných hodnot zvýšené produkce hyperosidu bylo dosaženo za použití nejnižší koncentrace elicitoru C_3 ($3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l) v časech 6 a 48 hodin. Nejvyšší nárůst obsahu byl zaznamenán po 6 hodinách odběru suspenní kultury ($17,7 \mu\text{g/g DW}$), kde obsah hyperosidu činil rozdíl o 1770 % oproti kontrolnímu vzorku. V čase 48 hodin byla tato produkce navýšena o 369 %. Produkce v ostatních případech nebyla metodou elicítace nijak ovlivněna. (Tab. č. 6, Graf č. 4)

Živná média suspenních kultur

V živných médiích suspenních kultur byly po působení elicitoru v koncentraci C_1 a C_2 naměřeny hodnoty obsahu hyperosidu vyšší oproti samotné kultuře, ačkoliv první dva vzorky po 6 a 24 hodinách v obou případech nepřesáhly hodnoty stanovené z kontrolního vzorku. Nejvyšší obsah uvolněného hyperosidu byl stanoven po 72 hodinách elicítace elicitorem v koncentraci C_2 , který činil pouze o 3,9 % více než obsah hyperosidu v kontrolním vzorku. U suspenní kultury po aplikaci elicitoru v koncentraci C_3 nebylo zaznamenáno uvolňování hyperosidu do živného media. (Tab. č. 7, Graf č. 5)

Nejvíce statisticky významné hladiny vyprodukovaného hyperosidu byly získány u suspenzní kultury po 6 hodinách elicitace, kdy v přítomnosti elicitoru C_3 ($3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l) byl detekován obsah hyperosidu $17,7 \mu\text{g/g DW}$. Tento rozdíl činil o 1770 % více oproti kontrolnímu vzorku. Rozdíl v produkci byl významný také v čase 48 hodin a představoval 369 %. (Tab. č. 6, Graf č. 4)

Jako statisticky významný se jeví i obsah hyperosidu, který byl ve vyšší míře uvolněn do živného média kalusové kultury oproti kultuře samotné. Zde bylo po 24 hodinách aplikace elicitoru o koncentraci C_3 ($3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l) zjištěno množství hyperosidu $1,164 \mu\text{g/ml}$ s rozdílem 119,9 % oproti kontrole. (Tab. č. 5, Graf č. 3)

Při experimentu vlivu elicitoru 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamidu na produkci sekundárního metabolitu hyperosidu v *in vitro* kalusových a suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L. bylo zjištěno, že statisticky nejvýznamnějších hodnot obsahu bylo dosaženo u kultur suspenzních. V suspenzních kulturách docházelo díky většímu povrchu jednotlivých buněk nebo jejich shluků k lepšímu kontaktu s živným médiem i samotným elicitem. Tak lze vysvětlit mnohonásobně zvýšenou produkci tohoto sekundárního metabolitu oproti kultuře kalusové. Také lze říct, že elicitor o nejnižší koncentraci $C_3 = 3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l se jevil jako neúčinnější v porovnání s koncentrovanějšími roztoky elicitoru u obou kultur. Obecně byl tento sekundární metabolit velmi často uvolňován do odpovídajících živných medií kalusových i suspenzních kultur.

Syntetická sloučenina 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid se zdá být vhodným elicitem ke zvýšení produkce hyperosidu z kultury třezalky tečkované *in vitro*. Použitím vhodné koncentrace tohoto elicitoru po jasně stanovenou dobu a za využití co nejmladších kultur s vysokou schopností regenerace lze dosáhnout příznivých výsledků.

Účinkem abiotických elicitorů na zvýšení sekundárního metabolismu rostlin se zabývalo několik prací:

- V práci M. Kašparové, T. Siatky, R. Klimešové a J. Duška byl zjišťován vliv syntetického derivátu 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu na produkci flavonoidů a isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* (Tempus). Zjistilo se, že elicitor pozitivně ovlivnil produkci těchto sekundárních metabolitů. Vystavením suspenzní kultury elicitoru o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ došlo v čase 48 hodin k maximální produkci flavonoidů (1,13 mg/g DW), což činilo o 438 % vyšší nárůst oproti kontrole (52).
- Diplomová práce studentky T. Hanzlíkové sledovala vliv abiotického elicitoru 2,4,6-trimethyl-*N*-(pyrazin-2-yl)benzensulfonamidu na produkci flavonoidů rutinu, hyperosidu a kvercetinů v kalusových a suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L. Zvýšená produkce byla pozorována především u rutinu, kdy nejvyšších hodnot (0,169 mg/g DW) bylo dosaženo na kalusových kulturách po 168 hodinách působení elicitoru C_1 ($3,6057 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Nárůst oproti kontrole činil 1777 % (54).
- V rigorózní práci se K. Sojková zabývala vlivem oxidu seleničitého na produkci kvercetinů a hyperosidu v kalusových a suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u obou flavonoidů na suspenzních kulturách. Po 6 hodinách elicitace elicitelem C_1 ($9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l) byla získána hodnota kvercetinů 0,37 mg/g DW (0,37 %). Významná produkce hyperosidu nastala po 168 hodinách za působení stejného elicitoru, hodnota činila 0,2 mg/g DW (0,2 %) (55).

7 ZÁVĚR

Podstatou této diplomové práce bylo zjistit vliv 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamidu jako abiotického elicitoru ve třech koncentracích na produkci sekundárního metabolitu hyperosidu v kalusových a suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L.

Ze získaných výsledků provedeného experimentu jsem došla ke zjištění:

- Ve vzorcích byl pomocí analytické metody HPLC detekován flavonoid hyperosid.
- Kalusové i suspenzní kultury dosahovaly statisticky významných hodnot obsahu po aplikaci elicitoru o koncentraci $C_3 = (3,571 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$.
- Nejvyšší statisticky významná produkce hyperosidu byla zaznamenána v suspenzní kultuře po 6 hodinách (17,7 $\mu\text{g/g DW}$) působení elicitoru v koncentraci C_3 . Při použití stejného elicitoru byl významný obsah flavonoidu nalezen také po 48 hodinách (3,69 $\mu\text{g/g DW}$).
- V kontrolních vzorcích kalusových i suspenzních kultur v čase 24 a 168 hodin nebyl obsah hyperosidu vyšší než 0,01 $\mu\text{g/g DW}$.
- Hyperosid byl také uvolňován do živných médií obou kultur.
- U kalusových kultur byl hyperosid vylučován do živného média ve větší míře oproti kulturám suspenzním, maximální produkce nastala po 24 hodinách elicítace elicitem C_3 a činila 1,199 $\mu\text{g/ml}$.
- Kontrola k živnému médiu suspenzní kultury dosahovala po 24 hodinách množství hyperosidu 0,033 $\mu\text{g/ml}$, v ostatních případech kontrol nebylo dosaženo hodnot větších než 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

Z výše zmíněných výsledků vyplývá, že roztok sloučeniny 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamidu je za specifických podmínek účinným elicitem. Nejpriznivějšího účinku na produkci sekundárního metabolitu dosahuje především elicitor o koncentraci $C_3 = (3,571 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$ po 6 hodinách působení na suspenzní kulturu *Hypericum perforatum* L.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Naik P. M., Al-Khayri J. M. Abiotic and biotic elicitors-Role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants in: Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives. IntechOpen Science. 2016; 247-277.
2. Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta. 2018; 248(1), 1–18.
3. Crockett S. L., Robson N. K. B. Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. 2011; 5(Special Issue 1), 1–13.
4. Dauncey E. A., Irving J. T. W., Allkin R. A review of issues of nomenclature and taxonomy of *Hypericum perforatum* L. and Kew's Medicinal Plant Names Services. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2019; 71(1), 4–14.
5. Koch M. A., Scheriau C., Betzin A., Hohmann N., Sharbel T. F. Evolution of cryptic gene pools in *Hypericum perforatum*: the influence of reproductive system and gene flow. Annals of Botany. 2013; 111(6), 1083–94.
6. http://botanika.borec.cz/trezalka_teckovana.php [citováno 7. listopad 2020].
7. <https://zdravazona.cz/atlas/trezalka-teckovana/> [citováno 7. listopad 2020].
8. Kolektiv autorů. Český lékopis 2017. Praha: Grada Publishing a.s., 2017; 1438 - 1874.
9. <https://apps.faf.cuni.cz/MikroskopieDrog/DrugMount.asp?id=1048&DrugType=Herb> a [citováno 21. listopadu 2020].
10. Vacek J., Klejdus B., Kubáň V. Hypericin a hyperforin: biologicky aktivní komponenty třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*). Jejich izolace, analýza a studium fyziologických účinků. Česká a slovenská farmacie. 2007; 56, 62-66.
11. Di Pierro F., Risso P., Settembre R. Role in depression of a multi-fractionated versus a conventional *Hypericum perforatum* extract. Panminerva Medica. 2018; 60(4).
12. <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/trezalka-teckovana-kviti-svateho-jana-271471> [citováno 20. listopadu 2020].

- 13.** Patočka J. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine*. 2003; 1(2), 61–70.
- 14.** Nagy M., Mučaji P., Grančai D. *Farmakognózia: Biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje*. 2. Vydání. Bratislava: Herba, s.r.o. 2017.
- 15.** Nagy M., Grančai D., Mučaji P. *Farmakognózia, Biogenéza prírodných látok*. 1. Vydání. Slovenská republika: Osveta, s.r.o. 2011.
- 16.** Oliveira A. I., Pinho C., Sarmiento B., Dias A. C. P. Neuroprotective Activity of *Hypericum perforatum* and Its Major Components. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7, 1004.
- 17.** Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M. *Farmakognozie*. Karolinum Praha: Univerzita Karlova v Praze. 2016.
- 18.** https://www.uptodate.com/contents/clinical-use-of-st-johns-wort?sectionName=Depression&search=hypericum%20perforatum&topicRef=1227&anchor=H7&source=see_link#H7 [citováno 16. listopadu 2020].
- 19.** <https://www.nccih.nih.gov/health/st-johns-wort> [citováno 10. listopadu 2020].
- 20.** Borrelli F., Izzo A. A. Herb–Drug Interactions with St John’s Wort (*Hypericum perforatum*): an Update on Clinical Observations. *The AAPS Journal*. 2009; 11(4).
- 21.** Wölfle U., Seelinger G., Schempp C. M. Topical Application of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*. 2014; 80(2/3), 109–20.
- 22.** Chung D. J., Kim H. Y., Park K. H., Jeong K. A., Lee S. K. et al. Black Cohosh and St. John’s Wort (GYNO-Plus®) for Climacteric Symptoms. *Yonsei Medical Journal*. 2007; 48(2), 289–94.
- 23.** Jendželovská Z., Jendželovský R., Kuchárová B., Fedoročko P. Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7, 560.
- 24.** Henderson L., Yue Q. Y., Bergquist C., Gerden B., Arlett P. St John’s wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2002; 54(4), 349–56.

- 25.** Schmitt L. A., Liu Y., Murphy P. A., Petrich J. W., Dixon P. M., Birt D. F. Reduction in hypericin-induced phototoxicity by *Hypericum perforatum* extracts and pure compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology - Elsevier*. 2006; 85(2), 118–30.
- 26.** Park J. Y., Han X., Piao M. J., Oh M. C., Fernando P. M. D. J. et al. Hyperoside Induces Endogenous Antioxidant System to Alleviate Oxidative Stress. *Journal of Cancer Prevention*. 2016; 21(1), 41–7.
- 27.** Berkocz M. Effect of hyperoside on the inhibition of adipogenesis in 3t3-l1 adipocytes. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*. 2019; 15(2), 165–72.
- 28.** Kumar S., Pandey A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013; 16.
- 29.** Liu C. Y., Bai K., Liu X. H., Zhang L. M., Yu G. R. Hyperoside protects the blood-brain barrier from neurotoxicity of amyloid beta 1–42. *Neural Regeneration Research*. 2018; 13(11), 1974–80.
- 30.** http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz-MKTB_CHEK-b76177dd28.pdf [citováno 2. ledna 2021].
- 31.** https://home.czu.cz/storage/54233_Kultury-rostlin-in-vitro.pptx [citováno 2. ledna 2021].
- 32.** http://botany.upol.cz/pagedata_cz/vyukove-materialy/87_teksb-2011-2012-www.pdf [citováno 10. listopadu 2020].
- 33.** Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*. 2013; 25(9), 3159–73.
- 34.** Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1 přeprac. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého 1995; 1-82.
- 35.** Saad A. I. M., Elshahed A. M. Plant Tissue Culture Media. In: Leva A. ed.: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. IntechOpen Science. 2012; 29-40.
- 36.** <https://www.plantcelltechnology.com/pct-blog/tissue-culture-medium-types-and-5-steps-of-selection/> [citováno 3. listopadu 2020].
- 37.** https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi6120/um/56137301/02_media_2015.pdf [citováno 4. listopadu 2020].

- 38.** Procházka S., Macháčková I., Krehule J., Šebánek J. Fyziologie rostlin. Academia Praha 1998; 226–284, 412–430.
- 39.** Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biological Research. 2019; 52(1), 39.
- 40.** Suzuki N., Rivero R. M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. Abiotic and biotic stress combinations. New Phytologist. 2014; 203(1), 32–43.
- 41.** Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta. 2018; 248(1), 1–18.
- 42.** Mañero F. J. G., Algar E., Gómez M. S. M., Sierra M. D. S., Solano B. R. Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. Pharmaceutical Biology. 2012; 50(10), 1201–9.
- 43.** Angelova Z., Georgiev S., Roos W. Elicitation of Plants. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2006; 20(2), 72–83.
- 44.** Moura J. C. M. S., Bonine C. A. V., Viana J. D. O. F., Dornelas M. C., Mazzafera P. Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. Journal of Integrative Plant Biology. 2010; 52(4), 360–76.
- 45.** Menaka T., Sujata B., Prem K. K., Sunil P. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. In: Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. Elsevier. 2019; 1-12.
- 46.** Vasconsuelo A., Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science. 2007; 172, 861–75.
- 47.** Patel H., Krishnamurthy R. Elicitors in Plant Tissue Culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2013; 2(2), 6.
- 48.** Rahman Z. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. Pharmacognosy Reviews. 2007; 69-79.
- 49.** Prathima P., Sethy S. P., Sameena T., Shailaja K. Pyridine and Its Biological Activity: A Review. Asian Journal of Research in Chemistry. 2013; 888-899.
- 50.** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1049> [citováno 3. ledna 2021].

- 51.** Liu H., Kotova T. I., Timko M. P. Increased Leaf Nicotine Content by Targeting Transcription Factor Gene Expression in Commercial Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Genes* (Basel). 2019; 10(11).
- 52.** Kašparová M., Siatka T., Klimešová R., Dušek J. Vliv syntetického benzylsulfanylpyridinového derivátu na produkci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. *Chemické listy* 2012; 106, 660-664.
- 53.** Lukšíková L. HPLC analýza léčiv. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2009.
- 54.** Hanzlíková T. Vliv derivátů pyrazinu na obsah sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách rostlin II. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2020.
- 55.** Sojková K. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních látek v *in vitro* kulturách léčivých rostlin. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2014.

9 ABSTRAKT

Rostliny jsou zdrojem široké škály sekundárních látek, které díky svým účinkům nachází využití v mnoha oblastech zaměření. Metodou nazývanou elicitace můžeme dosáhnout jejich vyšší a tím i efektivnější produkce. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda abiotický elicitor 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid může pozitivně ovlivnit produkci flavonoidu hyperosidu v kalusové a suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L.

Ke kulturám *in vitro* byl elicitor přidáván ve třech koncentracích: $C_1 = 3,571 \cdot 10^{-3}$ mol/l; $C_2 = 3,571 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $C_3 = 3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l. V pravidelných časových intervalech byl po 6, 24, 48, 72 a 168 hodinách působení elicitoru odebrán vzorek. Odběr kontrolních vzorků byl proveden po 24 a 168 hodinách. Obsah vyprodukovaného hyperosidu byl následně stanoven za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Současně bylo sledováno také množství uvolněného hyperosidu do živných médií obou rostlinných kultur.

Maximální produkce hyperosidu byla zaznamenána v suspenzní kultuře po 6 (17,7 $\mu\text{g/g DW}$) a 48 hodinách (3,69 $\mu\text{g/g DW}$) působení elicitoru o nejnižší koncentraci C_3 ($3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Obsah hyperosidu v prvním případě činil o 1770 % více v porovnání s kontrolním vzorkem. V kalusových kulturách docházelo k významnému uvolnění množství hyperosidu do živného média, kdy nejvyšší hodnoty byly detekovány v čase 24 hodin po působení elicitoru v koncentraci C_3 s rozdílem 119,9 % oproti kontrole. Produkce hyperosidu v kalusových i suspenzních kulturách po aplikaci elicitoru v koncentraci C_1 a C_2 nebyla tolik významná.

Z experimentu plyne, že elicitor 2-(4-chlorfenyl)-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid může za specifických podmínek zvýšit produkci hyperosidu v kalusových i suspenzních kulturách třezalky tečkované.

10 ABSTRACT

Plants are a source of a wide range of secondary substances, which due to their effects find use in many areas of focus. By a method called elicitation, we can achieve their higher and thus more efficient production. This diploma thesis aimed to determine whether the abiotic elicitor 2-(4-chlorophenyl)-*N*-(5-chloropyridin-2-yl)acetamide can positively affect the production of the flavonoid hyperoside in callus and suspension culture of *Hypericum perforatum* L.

The elicitor was added to the *in vitro* cultures in three concentrations: $C_1 = 3,571 \cdot 10^{-3}$ mol/l; $C_2 = 3,571 \cdot 10^{-4}$ mol/l and $C_3 = 3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l. A sample was taken at regular intervals after 6, 24, 48, 72 and 168 hours of elicitor treatment. Control samples were taken after 24 and 168 hours. The content of hyperoside produced was subsequently determined using High Performance Liquid Chromatography. Simultaneously, the amount of hyperoside released into the nutrient media of both plant cultures was also monitored.

Maximum hyperoside production was recorded in suspension culture after 6 (17,7 $\mu\text{g/g}$ DW) and 48 hours (3,69 $\mu\text{g/g}$ DW) of elicitor treatment with the lowest concentration of C_3 ($3,571 \cdot 10^{-5}$ mol/l). The content of hyperoside in the first case was 1770 % higher compared to the control sample. There was a significant release of hyperoside into its nutrient media in callus cultures with the highest values being detected in 24 hours after exposure of elicitor in concentration C_3 with a difference of 119,9 % compared to the control. The production of hyperoside in callus and suspension cultures after application of elicitor in concentration C_1 and C_2 was not so significant.

The experiment shows that the elicitor 2-(4-chlorophenyl)-*N*-(5-chloropyridin-2-yl)acetamide can increase the production of hyperoside in callus and suspension cultures of St. John's wort under specific conditions.