

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY
A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Explantátové kultury vyšších rostlin 25

Hradec Králové 2006

Marie Vránová

Na tomto místě bych chtěla předně poděkovat vedoucí mé diplomové práce Doc. RNDr. Jiřině Duškové, Csc. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a všestrannou pomoc při vypracovávání této diplomové práce.

Současně bych také ráda poděkovala laborantce Markétě Šimůnkové za pomoc a ochotu a paní Ireně Rejlové za provedení kvantitativní analýzy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

OBSAH

1. Úvod	3
2. Řešená problematika	7
3. Teoretická část	9
3.1. Botanická a fytochemická charakteristika.....	10
3.1.1. Zařazení do botanického systému.....	11
3.1.2. Popis <i>Centella asiatica</i>	12
3.1.3. Fytochemická charakteristika.....	14
3.2. Farmakologické účinky a využití <i>Centella asiatica</i>	15
3.3. Poslední klinické výzkumy.....	16
3.4. Produkce farmaceut.významných látek pomocí rostlinných tkáňových kultur.....	19
4. Experimentální část	36
4.1. Přístroje.....	37
4.2. Chemikálie.....	37
4.3. Použitý biologický materiál.....	38
4.4. Biotransformační pokusy.....	39
4.5. Analýza obsahových látek.....	39
5. Výsledky	42
5.1. Výsledky TLC analýzy.....	45
5.2. Výsledky HPLC analýzy.....	49
6. Diskuze	57
7. Závěr	61
8. Literatura	63

1. Úvod

Rostlinná říše je s člověkem dokonale spjata od prvopočátku jeho existence. Hrála nezastupitelnou roli v oblasti jeho zdrojů potravy, vždyť člověk byl nejprve sběrač rostlin, tedy živil se jen stravou rostlinného původu a až dalším vývojem se z něj stal lovec, tedy všežravec, v oblasti stavby obydlí, poskytování světla, tepla a v neposlední řadě je zde i terapeutická role fytofarmak, tedy látek, které svůj původ odvozují právě z rostlinné říše. Tvoří dnes asi 80 % všech přírodních produktů, které ze zhruba 30 tisíc využíváme.

Stále ještě nejběžnějším a nejvýnosnějším způsobem získávání fytofarmak je polní pěstování léčivých rostlin. Velikost úrody, ale i množství obsahových látek v bylinách samotných je ovlivněna řadou faktorů. K těm nejzákladnějším patří zeměpisná poloha, nadmořská výška a celkové klima, dále nesmíme opomenout problémy se kterými se zemědělci setkávají. Nejsou to jen výkyvy počasí (sucho nebo naopak příliš mnoho srážek, chlad, přílišné teplo atd.) ale také ataky řady rostlinných chorob a škůdců. K dobré úrodě neodmyslitelně patří kvalitní osivo a samozřejmě kvalitní hnojiva, což je nejen finančně dosti náročné, ale dokonce v zemích třetího světa zcela nedostupné.

Na rozdíl od živočichů, kde procesy buněčné a tkáňové diferenciacie jsou obecně ireverzibilní, existuje u rostlin schopnost přechodu diferencovaných buněk a pletiv do meristematického stavu charakterizovaného intenzivním buněčným dělením (1).

Tak mohou rostliny růst v definovaných kultivačních mediích ve sterilním prostředí za regulovatelných světelných a teplotních podmínek. Do kultivačních medií se přidává vedle minerálních živin sacharosa, vitamíny B1 a B6, kyselina nikotinová, některé aminokyseliny a fytohormony (2).

První zmínky o snaze vykultivovat rostlinu jen z části jejího orgánu a pak dále sledovat jejich vývoj nacházíme už v 17. století u vědce Marcella Malphighiho (1628-1694), který jako první vědec systematicky využíval mikroskop a jež je také považován za zakladatele oboru histologie a popisné embryologie (3).

Na začátku minulého století se německý fyziolog Gottlieb Haberland (1854-1946) (3) pokoušel regenerovat jedince z izolovaných rostlinných buněk, ale

k buněčnému dělení nedocházelo (4). Jeho myšlenka ale vycházela ze zcela správné úvahy Schwanna a Schleidena z roku 1838 o totipotenci rostlinných buněk (1). Přes svůj neúspěch však pan Haberland určil směr dalšího vývoje explantátových kultur, který se soustředil na vývoj optimálního kultivačního média a poměru obsahu jednotlivých růstových látek v tomto živném médiu (5).

Vzhledem ke stále se zvyšující náročnosti na kvantitu a zejména kvalitu obsahových látek je jasné, že dodavatelé rostlinných surovin pro farmaceutický průmysl hledají stále nové způsoby produkce. Jedním z možných řešení tak může být využití rostlinných tkáňových kultur. Jedná se tedy o komplex metod založených na pěstování izolovaných částí rostliny (orgány, pletiva, buňky) bohatých na sekundární látky v podmínkách *in vitro*.

K tradičním způsobům vegetativního množení rostlin se v posledních desetiletích řadí metoda tkáňových kultur-tzv.mikropropagace. I přes svou vyšší finanční nákladnost, má tento typ rozmnožování své uplatnění především tam, kde není možná jiná metoda vegetativního množení nebo rychlost množení tradičními metodami je pomalá, makropropagace je velmi nákladná, cílem vegetativního množení je získat naprosto zdravý materiál, cílem množení je urychlení šlechtitelských programů a pro nás velmi zajímavá metoda produkce nebo dokonce zvýšené produkce sekundárních metabolitů kulturami rostlin.

Metody teoreticky použitelné k mikropropagaci můžeme v zásadě rozdělit do dvou hlavních tříd (6) :

1. množení rostlin indukci tvorby prýtlů z axiálních pupenů
2. tvorbu adventivních prýtlů nebo adventivních somatických embryí a to
 - a) přímou morfogenezi, při které vznikají struktury prýtlů či embryí přímo na částech orgánů nebo pletiv
 - b) nepřímou morfogenezi, kdy uvedené struktury vznikají z kalusového pletiva nebo v suspenzní kultuře, které byly získány dělením nediferencovaných buněk původního explantátu.

Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk, jehož růst je indukován umístěním explantátů na medium s relativně vysokou koncentrací auxinu (1-10mg/l) v přítomnosti naopak nižší koncentrace cytokininu nebo zcela bez

něho. Odvozený kalus může být dále kultivován na pevném mediu nebo jej můžeme použít k odvození suspenzní kultury v tekutém mediu jejím důkladným mechanickým protřepáním (6).

Hlavní období vývoje optimálních podmínek pro růst a produkci sekundárních metabolitů je dle Schmaudera a Doebela mezi lety 1975-1985 (5). Výsledky podporovaly další výzkumy v průmyslovém měřítku. Japonská firma Mitsumi Petrochemical Industrie (7) využila suspenzních tkáňových kultur *Lithospermum erythrorhizon* pro získání šikoninu. V USA se v současné praxi nevyužívá, ale přesto byla velmi úspěšná produkce sanquinarinu (8) kulturami *Papaver somniferum*. Německá firma Phyton gesellschaft für biotechnik používá kultury rodu *Taxus* jako zdroj taxolu (9).

2.Řešená problematika

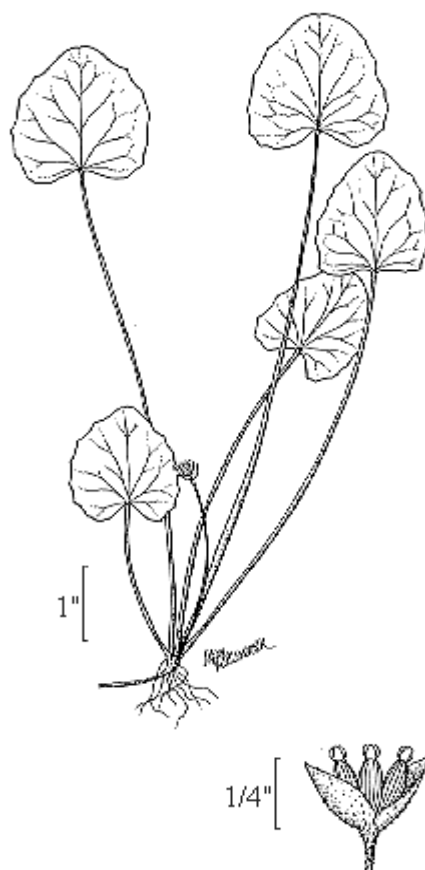
Úkolem mé diplomové práce bylo odvození explantátové kultury *Centella asiatica* a ověření biotransformačních schopností této explantátové kultury, a to metodou přidávání exogenních prekurzorů arbutinu do živného média. Jako prekurzory byly použity hydrochinon, kyselina p-kumarová, kyselina 4-hydroxybenzoová a tyrosin. Kvalitativní skladba předpokládaných metabolitů těchto látek byla sledována pomocí TLC. Kvantitativní hodnocení bylo provedeno metodou HPLC.

3. Teoretická část

3.1. Botanická a fytochemická charakteristika



Obr.1 Intaktní rostlina *Centella asiatica*



Obr. 2 Botanický náčrt habitu a květu rostliny *Centella asiatica*

3.1.1. Zařazení do botanického systému (10)

- říše – PLANTAE
- oddělení – MAGNOLIOPHYTA
- třída – MAGNOLIOPSIDA
- podtřída – CORNIDAE
- řád – ARALIALES
- čeleď – HYDROCOTYLACEAE
- rod – CENTELLA
- druh – CENTELLA ASIATICA

Synonyma:

Centella coriacea Nannfd., *Centella erecta* (L.f.) Fernald, *Hydrocotyle asiatica* L., *Hydrocotyle lunata* L., *Hydrocotyle wightiana* Willd., *Trisanthus cochinchinensis* Lour. (11, 12).

Názvy v mimoevropských jazycích:

Brahmi, Thankuni, Thankuria (bengálsky), Ji-Xue-Cao (čínsky), Indian Pennywort, Marsh penny, Sheep-rot, Spadeleaf (anglicky), Bemgsag, Brahma manduki, Brahmi, Mandukaparni, Thankuni (hindsky), Daun kaki kuda (indonésy), Gagan-gagan, Pegaga, Pegagan, Kerok batok (javánsky), Brahambuti, Ghodtaapre (nepálsky), Bua bok, Phak nok, Phak waen (thajsky), Cáy rau má (vietnamsky) (13)

Názvy v evropských jazycích:

Pupečník asijský (česky), Centelle asiatique, Écuelle d'eau, Fausse violette (francouzsky), Asiatischer Wassernabel (německy), Erba delle tigri, Idrocotile, Scodella d'acqua (italsky), Hierba de clavo, Sombrerito (španělsky) (13)

3.1.2. Popis *C. asiatica***a) Makroskopický (intaktní rostlina)**

Drobná, vytrvalá, léčivá rostlina původem z Indie, Číny, Indonésie, Austrálie, jižního Pacifiku, Madagaskaru a jižní nebo střední Afriky. Roste nejlépe v zapadlých bažinatých oblastech, zejména podél potoků, ve vlhkých příkopech, močálovitých lesích, na písčitéch březích a to až do nadmořské výšky 700 m.n.m. Vzhled této štíhlé rostliny se mění právě podle toho, roste-li ve vodě (široké vějířovité listy) nebo na suchu (malé tenké lístky) (14,15,16).

Tato tenká popínavá bylina má vláknitou lodyhu plazící se po zemi, často načervenalou, s dlouhými internodii, zakořeňujícími v uzlinách (14).

Listy mají proměnlivou velikost. Jsou více široké než dlouhé, kdy čepel je 10-40 mm dlouhá a 20-40 mm široká (někdy až 70 mm). Žilnatina je dlanitá, obvykle se sedmi žilkami. Tvar listu je nejčastěji ledvinovitý, okrouhlý či oválně eliptický. Hrot je zaokrouhlený, baze listu je dokonale srdčitá. Mladé lístky jsou nasponu ochmýřené, starší olysalé. Okraj může a nemusí být vroubkovaný. Z každé uzliny vyrůstají lístky střídavě v počtu 1-5, a jsou tedy uspořádány v růžici. Řapík je

obvykle pět až desetkrát, někdy i patnáctkrát delší než čepel, je hladký nebo s jemnými chloupky (14,22).

Květenství je úžlabní jednoduchý okolík složený z 1-3 květů. Malé květy jsou pouhé 2 mm velké, oboupohlavní, pětičetné, nazelenalé, růžové nebo načervenalé. Okvětních lístků je 5 (vzájemně nesrostlých) a jsou především bílé, někdy však zbarvené do červena. Kališní lístky nejsou přítomny. Tyčinek je 5, semeník je spodní. Z každé uzliny vyrůstá asi 1-5 okolíků, přičemž květní stopka je mnohem kratší než řapík listu. Rostlina kvete v období od května do srpna (14,22).

Plod je 8 mm velká, tvrdá, nepukavá dvounažka, která je nejčastěji hnědošedé barvy a vejčitého tvaru. Ze stran je silně zploštělá, se sedmi až devíti vyniklými zakřivenými žebry. Charakteristické je silně ztlustělé oplodí. Semena jsou hnědá, protáhlá, laterálně zploštělá (12, 14, 15).

Droga je nať (Centellae herba), která se sbírá nejčastěji na jaře a také na podzim. Typický je její charakteristický zápach a nepatrně sladkohořká chuť (11).

b) Mikroskopický (řapík+list)

Pokožka (epidermis) je tvořena jednou vrstvou těsně přiléhajících buněk, které neobsahují chloroplasty. V nich jsou na obou stranách listu přítomny paracytické a diacytické typy průduchů, přičemž větší množství převažuje na spodní straně listu. Na povrchu je pokožka kryta tenkou vrstvou kutikuly.

Mezofyl je tvořen dvěma řadami palisádových buněk a třemi řadami buněk houbového parenchymu, mezi nimiž se nachází velké množství mezibuněčného prostoru, který bývá vyplněný růžicovými krystaly, tvořenými oxalátem vápenatým.

Na příčném řezu řapíkem je patrná epidermis se ztlustělou vnitřní stěnou, kolenchym složený ze 2-3 vrstev buněk a široká vrstva parenchymu. Uvnitř parenchymatické zóny je 7 cévních svazků, z toho 5 tvoří centrální větev a 2 vybíhají v raménka.

Oblast hlavní žilky listu vykazuje 2–3 vrstvy kolenchymatických buněk bez chloroplastů. Cévy měří v průměru 15-23 μm . Některé parenchymatické buňky obsahují krystaly šťavelanu vápenatého (11, 12).

c) Mikroskopický popis drogy (17)

Prášková droga je charakteristická těmito znaky: pokožka listu obsahuje mnohohranné buňky s nepravidelně rýhovanou kutikulou, paracytické průduchy jsou četnější na spodní straně listu; pokožka řapíku s protáhlými buňkami; dlouhé, jednobuněčné, jednořadé, někdy mnohobuněčné zprohýbané krycí chlupy; mladé lístky; cévy šroubovitě ztlustlé; pryskyřičné kanálky; krystaly a drúzy šťavelanu vápenatého o průměru až 40 μm ; svazky úzkých komůrkových vláken stonku; úlomky plodu s vrstvami širokých, parketovitě uspořádaných buněk, cévami kruhovitě ztlustlými a buňkami parenchymu obsahujícími jednoduchá nebo složená škrobová zrna.

3.1.3. Fytochemická charakteristika

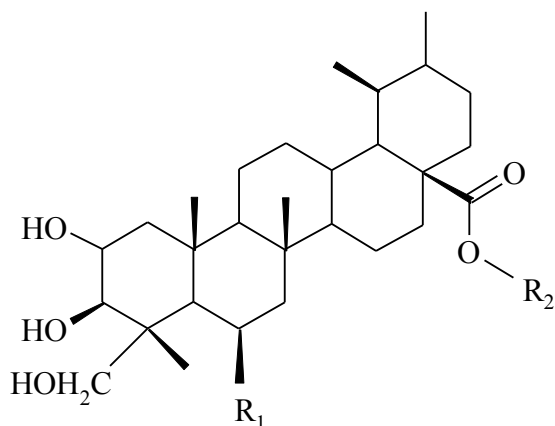
Hlavní obsahové látky

Největší podíl sekundárních metabolitů *Centella asiatica* tvoří pentacyklické triterpenoidní saponiny **asiaticosid** (0,1–0,6%) a **madecassosid** (0,7–5,0%). Kromě nich jsou také přítomny jejich aglykony **kyselina asiaticová** (0,1–0,5%) a **kyselina madecassová** (0,5–0,8%) (11).

Struktura asiaticosidu a jeho aglykonu byla objasněna chemickými a spektrálními metodami. Jedná se o triglykosid asiaticové kyseliny spolu s cukernými zbytky (dvou glukos a jedné rhamnosy).

Madecassosid a jeho aglykon madecassová kyselina byly strukturálně zkoumány v rostlině *C. asiatica*, sbírané na Madagaskaru. Kromě toho byly tyto metabolity izolovány i z rostlin sbíraných v Číně a také v Indii, kde byly pojmenovány jako brahmosid a kyselina brahmová.

Všechny tyto triterpeny jsou odvozeny od kyseliny ursolové a mají ursanový skeleton (18).



Asiaticosid: $R_1 = H$, $R_2 = \text{rha-glc-glc}$

Madecassosid: $R_1 = OH$, $R_2 = \text{rha-glc-glc}$

Kyselina asiaticová: $R_1 = H$, $R_2 = H$

Kyselina madecassová: $R_1 = OH$, $R_2 = H$

Obr.3 Chemická struktura hlavních sekundárních metabolitů *C. asiatica* (11)

3.2. Farmakologické účinky a využití *Centella asiatica*

Centella asiatica byla díky svým léčebným schopnostem lidmi používána již od starověku. Mnozí vědci se dnes pokoušejí vyvinout nové léky z přírodních zdrojů, kde využívají pradávných zkušeností léčitelů. Mezi bohaté zdroje těchto cenných informací patří například tradiční indická medicína zvaná Ayurveda. *Centella* zde patří do skupiny s názvem Vranaropaka (19), což je termín pro několik rostlinných nebo živočišných drog a minerálů s výrazným hojivým účinkem. Proto byla užívaná k léčbě různých patologických stavů, chronických ran a malomocenství. Ale je také doporučována jako mozkové stimulant u rozličných mentálních poruch. Její hojivé účinky jsou popisovány i v lidové medicíně Malajského poloostrova, Jávy, Madagaskaru a Keni, kdežto v Číně byla známá pro svůj psychotropní účinek. Jak dále uvádí čínský lékopis může být využita jako antipyretikum, diuretikum a také při žloutence, úpalu, průjmu, ekzémech a traumatech (14).

Nejvíce terapeuticky aktivních látek obsahuje nať a listy, z nich se může připravovat čaj nebo džus, mohou se žvýkat, ale výluh lze použít i k obkladům. Ve farmaceutickém průmyslu je *C. asiatica* zpracovávána do tablet, kapslí, krémů, gelů a olejů. Nejčastěji však bývá použita ve formě etanolickeho extraktu. Dnes přípravky z extraktů listů *Centella asiatica* představují základ řady farmaceutických a kosmetických přípravků.

Její obsahové látky jako terpeny, flavonoidy a kumariny představují dobrý terapeutický potenciál pro venoaktivní preparáty, které jsou využívány při chronické žilní insuficienci dolních končetin a tvorbě varixů. Jejich užívání zlepšuje mikrocirkulaci a metabolickou aktivitu cév, cévní tonus, kapilární proud a zpevnění perivaskulární pojivové tkáně (14). V této souvislosti je *C. asiatica* používána také k léčbě hemoroidů.

Dále je *C. asiatica* využívána jako dnes velmi populární imunostimulans, čímž se míní látka, která nespecifickým způsobem povzbuzuje imunitní systém organismu a tím mu výrazně napomáhá bránit se okolním atakům stresových podnětů, které mohou působit psychicky i fyzicky. Tato důležitá vlastnost tak může vysvětlovat široké terapeutické využití *Centella asiatica* u řady dalších chorob a komplikací.

Mezi další možné účinky *C. asiatica* patří (14) :

Antiemetické, snižuje hladinu močoviny v krvi, v malých dávkách působí jako nervový stimulans, dále má projímavé, prokinetické, hypocholesterolemické, protizánětlivé a antipyretické účinky.

3.3. Poslední klinické výzkumy

Soumyanath a kol. (20) na univerzitě v Oregonu sledovali vliv etanolového extraktu *Centella asiatica*, dále jen CA, na vzrůst lidských SH-SY5Y buněk za přítomnosti nervového růstového faktoru (NGF). Přestože vodný extrakt v koncentraci 100 µg/ml byl zcela neefektivní, u nižší frakce etanolového extraktu, získaného pomocí chromatografie na silikagel, bylo prokázáno neuritové prodloužení. Největší aktivita byla nalezena v nepolární frakci (GKF4). Relativně polární frakce (GKF10, GKF14) také vykazovaly určitou aktivitu, ale nižší než zmiňovaná frakce GKF4. Je tedy možné, že *Centella* obsahuje víc jak jednu účinnou složku. Kyselina asiaticová (AA) byla nalezena právě ve frakci GKF4 a vykazovala značnou aktivitu už při koncentraci 1 µM. AA ovšem nebyla přítomná v GKF10 ani GKF14, což je jasným důkazem toho, že v CA musí být přítomny další účinné složky. Samečci krys Sprague-Dawley po podání etanolového extraktu *Centella* do

pitné vody v denní dávce 300-330 mg/kg prokázali rychlejší funkční zotavení a vzestup axonální regenerace (větší axonální mohutnost a větší myelinovanost vlákn). Ve srovnání s kontrolními výsledky je jasné, že axony rostou rychleji. Ethanolový extrakt tedy může být využit pro urychlení hojení a regeneraci neuronového poškození.

Na univerzitě v Shanghai (21) byl zkoumán možný antidepressivní účinek triterpenoidů obsažených v CA. Obsah monoaminových neurotransmiterů a jejich metabolitů v mozkové kůře krys, hipokampu a talamu byly vyhodnoceny pomocí HPLC a elektrochemického detektoru. Bylo jasně patrné významné zmenšení hladiny kortikosteroidů v séru a zvýšený obsah serotoninu, noradrenalinu, dopaminu a jejich metabolitů 5-HIAA, MPHG v mozku krys.

Univerzita Rajasthan v Jaipuru (Indie) (22) se věnovala výzkumu hepatoprotektivního účinku *Centella asiatica*. Byl zde pozorován výrazný vliv na jaterní buňky. Ionizované γ -záření kromě toho, že způsobuje přímé poškození, tvoří také zvláštní druhy reaktivního kyslíku, které jsou schopny přivodit celkovou destrukci různých orgánů. Podání výtažku CA 1 h před ozářením, v intenzitě dávky 100 mg/kg tělesné hmotnosti, se projevilo jako ochrana proti záření, které způsobuje poškození jater. Počet normálních nepoškozených hepatocytů byl vyšší ve skupině předem ošetřené CA ve srovnání s kontrolní skupinou, která takto ošetřena nebyla. Počet binukleárních buněk a abnormálních hepatocytů byl tedy menší ve srovnání se zvířaty ozářenými bez předběžná léčby CA (28).

Rao S.B. a kolektiv (23) z Kasturbské lékařské fakulty v Manipalu (Indie) na katedře radiobiologie, hodnotili nootropní účinek CA u myši. Tři měsíce starým samečkům švýcarských bílých myši byl perorálně aplikován vodný extrakt s odstupňovanými dávkami (200, 500, 700, 1000 mg/kg tělesné hmotnosti) po dobu 15dnů, aby došlo k výběru efektivní dávky. Zvířata byla testována v paprskovitém labyrintu, kde se projevila jejich učební a paměťová schopnost. Na základě těchto výsledků byl myším podáván extrakt *Centella asiatica* per os v množství 200 mg/kg po dobu 15dní a to patnáctý až třicátý den po porodu. Nootropní účinek byl vyhodnocován 31.den a 6 měsíců po porodu. Byly provedeny studie chování (testy na otevřeném poli, tma/světlo, paprskovitý labyrint), biochemické testy aktivity acetylcholinesterázy a histologické studie dendridického rozvětvení. Juvenilní i mladší dospělé myši prokázaly výrazně lepší výkony v labyrintech, ale lokomoční aktivita oproti kontrolním testům byla beze změny. Ošetření výtažkem CA mělo za

následek zvýšenou aktivitu acetylcholinesterázy v oblasti hipokampu. Aktivita hipokampálních dendritů CA3 byla také zvýšena, a to jak v místech křížení, tak větvení. Výsledky byly stejně prokazatelné jak po měsíci, tak po půl roce. Podávání extraktu z CA tedy ovlivňuje neuronovou morfologii a je schopno zlepšovat mozkové funkce juvenilních a mladých myši (29).

Punturee a kol. (24) se na lékařské univerzitě v Chiang Mai (Thajsko) zabýval imunomodulační aktivitou CA extraktů. *Centella* se v lidovém léčitelství používá k léčbě řady chorob. Mechanismy účinku jsou však převážně neznámé. Tato studie zkoumala vliv CA na imunitní odpověď. Myši, kterým byly podávány extrakty z pupečníku (v koncentraci 100 mg/kg) prokazovaly výraznější imunitní odpověď na primární i sekundární protilátky proti BSE ve srovnání s kontrolní skupinou. Současný výzkum odhalil imunomodulační aktivitu CA na nespecifickou buněčnou i humorální imunitní odpověď. Na základě těchto poznatků se vědci domnívají, že látky obsažené v *Centella asiatica* mohou mít výrazný chemoprotektivní nebo antineoplastický potenciál.

Gupta a Flora (25) zkoumali význam ochranné schopnosti extraktů CA, podávané v dávkách 100, 200 a 300 mg/kg jedenkrát denně orální formou, během vystavení působení arsenu v dávce 20 ppm v pitné vodě po dobu 4 týdnů. Zvířata vystavená expozici arsenu vykazovala významnou inhibici aktivity dehydratasy δ -aminolevulinové kyseliny (ALAD), okrajové snížení glutathionu (GSH) a vzrůst hladiny protoporphyrinu v krvi. U jaterního a ledvinového glutathionu došlo ke snížení, zatímco hladiny oxidovaného glutathionu (GSSG) a reaktivní substance kyseliny thiobarbiturové byly významně zvýšeny a to v játrech, ledvinách i mozku. Aktivita mozkové superoxiddismutázy (DRN) a katalázy byla po arsenové expozici snížena jen okrajově. Podáváním *Centella asiatica* byl prokázán významný ochranný vliv na inhibici aktivity krevní ALAD a obnovení krevních hladin GSH, ale většina dalších biochemických parametrů zůstala nezměněna. Zajímavé je, že většina jaterních biochemicky proměnných ukazatelů, udávajících oxidační tlak, ochranný vliv CA prokázaly. Jakkoliv významná protektivní funkce byla pozorována na změně ledvinové GSSG, jaterní a mozkové TBARS, byl zaznamenán jen okrajově prospěšný účinek na koncentraci arsenu v krvi a játrech, zvláště pak v nejvyšší studované dávce (300 mg/kg). *Centella* neměla vliv na změnu většiny ledvinových biochemických parametrů. Výsledky tak vedou k závěru, že simultánní suplementace CA významně ochraňuje organismus krys před oxidativním stresem vyvolaným

arsenem, ale nijak neovlivňují koncentraci samotného arsenu v orgánech těchto živočichů.

3.4. Produkce farmaceuticky významných látek pomocí rostlinných tkáňových kultur

3.4.1. Alkaloidy

Většina alkaloidů používaných jako léčiva jsou rostlinnými metabolity. Dosud byly nalezeny v přibližně 4000 rostlinných druhů a odhaduje se, že jsou přítomny až ve 20% všech rostlin. Jsou to přírodní organické látky obsahující dusík v heterocyklickém kruhu, mají výrazné, zpravidla velmi specifické účinky. Název „alkaloid“ pochází od alkalické povahy většiny těchto látek, mající proto schopnost tvořit soli s kyselinami. Alkaloidy se nejčastěji ukládají v pletivech vykazující velmi aktivní růst, v epidermálních a hypodermálních pletivech, v pochvách svazků cévních a v mléčnicích. Jsou zde většinou rozpuštěny v buněčné šťávě vakuoly a jejich obsah kolísá během vegetace (26).

3.4.1. 1. Morfinové alkaloidy (27)

Kodein je látka, která se používá jako analgetikum a antitusikum. Komerčním zdrojem je *Papaver somniferum*, odkud se získává společně s morfinem, který může být na kodein konvertován. Zralé makovice *P. bracteatum* obsahují více než 3,5 % thebainu, který je také modifikován na kodein. Z toho důvodu řada vědců předpokládala, že morfogeneticky diferencované buněčné kultury *P. bracteatum* budou produkovat vyšší hladiny thebainu. Tato teorie se ale nepotvrdila (28-31). K zajímavému výsledku dospěl Furuy et al (32). Kultury *P. somniferum*

neprodukovaly morfin ani kodein, ale norsanquinarin, sanquinarin, kryptopin a další různé druhy alkaloidů. Eilert et al. (33) pak pro zvýšení produkce sanquinarinu buňkami kultury *P. somniferum* použil přidání houby rodu *Botrytis sp.* Hladina alkaloidu v přítomnosti tohoto houbového elicitoru vzrostla 26krát a celkově došlo ke zvýšení hmotnosti sušiny o 29 % ve srovnání s médiem bez elicitoru.

Sanquinarin se přidává do zubních past jako prostředek proti plaku, jeho možnou komerční výrobou pomocí buněčných kultur se zabýval Kurz et al. v National Research Council of Canada a různé společnosti v USA. Syntéza thebainu a kodeinu *de novo* pomocí buněčných kultur se zatím nezdařila, proto Furuya et al. (34) studoval biotransformaci kodeinonu na kodein pomocí imobilizovaných buněk *P. somniferum*. Výtěžek této konverze byl 70,4 % a okolo 88 % biotransformovaného kodeinu bylo vyloučeno do živného média.

3.4.1. 2. Berberin

Berberin je isochinolinový alkaloid, který se nachází v kořenech *Coptis japonica* a kůře rostliny *Phellodendron amurense*. Berberin se v orientu používá k léčbě střevních potíží.

Furuya (35) a Yamamoto (36) zkoumali produkci berberinu buněčnými kulturami *C. japonica* od roku 1970. Yamada et al. (37) na univerzitě v Kyoto vyseletoval vysoce produktivní buněčné linie *C. japonica*, které byly postoupeny japonské společnosti Mitsui Petrochemical. Hara et al. (38) zjistil, že po přidání 10^{-8} M kyseliny giberelové do média došlo ke zvýšení produkce berberinu a to až o 1,66 g /l média. Použitím selekce buněk pomocí techniky buněčných protoplastů *C. japonica* získali vysoce produktivní buněčnou linii, dále založili „velkokapacitní buněčnou kulturu“ - postupy k zefektivnění produkce berberinu. Za účelem zisku buněčné masy o obsahu 70 g/l sušiny bylo optimalizováno množství kyslíku a vhodných živin.

Hara et al. (39) dále zjistil, že přidání alifatického polyaminu spermidinu stimuluje produkci berberinu suspenzními kulturami *Thalictrum minus*, přestože další polyamidy jako kadaverin, putrescin a spermin byly bez efektu. To signalizuje,

že spermidin zvyšuje tvorbu ethylenu, který má souvislost s aktivací syntézy berberinu. Maximální stimulační efekt byl pozorován při dávce 2mM spermidinu.

3.4.1.3. Tropanové alkaloidy

Skopolamin a hyoscyamin jsou komerčně využívány jako anestetická a antispastická léčiva. Tyto alkaloidy se vyskytují v listech rostlin rodu *Solanaceae* včetně *Datura myoporoides* a *D. leichhardtii*. Již před více než 35 lety West a kol. (27) našel tropanové alkaloidy v kalusu kultury *Atropa belladonna*, od té doby byla výzkumům biotransformačních schopností těchto buněčných kultur věnována velká pozornost. Koncentrace skopolaminu a hyoscyaminu v buněčných kulturách jsou však přes veškeré úsilí vědců stále velmi nízké, proto zatím nebyla v průmyslu uplatněna žádná z tkáňových kultur.

Tabata et al. (40) přidával do suspenzní kultury *Scopolia japonica* jako prekurzor kyselinu tropovou která zvýšila hladinu alkaloidu na patnáctinásobek. Mitsune et al. (41) vyseletoval vysoce produktivní typ buněk z druhu *Hyoscyamus niger*, který oproti mateřským buňkám produkoval 7krát více hyoscyaminu. Výsledky ale neprokázaly žádnou souvislost mezi vysokou produkční schopností a variacemi v počtu chromozomů. Endo a kol.(42), Kitamura a kol. (43) a řada dalších vědců oznámila, že kořeny diferencované z buněčných kultur akumulovaly skopolamin, hyoscyamin anebo nikotin. Přesto, Kitamura (43) zjistil, že alkaloidy nebyly akumulovány v listech regenerovaných klíčnicích rostlin. Protože tyto alkaloidy jsou tedy syntetizovány v kořenech, Flores a kol. (44) ukázali, že produkce hyoscyaminu a ostatních alkaloidů v kultivovaných „hairy roots“ transformovaných pomocí *Agrobacterium rhizogenes* je podobné úrovně jako v normálních kořenech.

3.4.2. Kardenolidy

Srdeční glykosidy, kardenolidy, jsou produkty rostlin rodu *Digitalis*. Některé z těchto druhů jsou využívány k léčbě srdečních chorob. Pro průmyslovou výrobu je náprstník pěstován na polích řady zemí, mimo jiné i v Nizozemí, Maďarsku a Argentíně. Jen pro zajímavost, firma Burroughs Wellcome vlastní ochrannou

známku na digoxinový lék s názvem Lanoxin. Tento výrobek zastupuje největší podíl trhu společnosti v oblasti kardiovaskulárních léků. Lanoxin je nejvíce prodáván v Itálii a USA, jeho roční prodej je přibližně 6000 kg s celkovým ziskem 50 miliónů amerických dolarů (27). Samozřejmě se výrobou a zpracováním kardioaktivních glykosidů zabývají i jiné firmy.

Studie tkáňových a buněčných kultur určených k produkci kardenolidů začaly před více než třiceti lety. Prvenství se připisuje zprávě z roku 1959 dvojice Hildebrand a Riker (45). Staba (46) již v roce 1962 zkoumal výživné požadavky tkáňových kultur *Digitalis lanata* a *Digitalis purpurea*. Přestože byla mnohokrát popsána produkce srdečních glykosidů tkáňovými kulturami rodu *Digitalis*, obecně bylo množství látek velmi malé a následným pasážováním buněčných kultur množství často ještě klesalo až vymizelo úplně. Mnoho vědců se ale shodovalo v poznatku, že morfologická diference způsobuje zvýšení výnosnosti. Například Lui a Staba (47) dokázali, že orgánová kultura odvozená z listů a kořenů *D. lanata* produkuje kardenolidy a během kultivace hladina digoxinu vzrůstá s rostoucím stářím. V tkáňových kulturách *D. lanata* a *D. purpurea* byly kromě digoxinu a digitoxinu nalezeny další druhy sekundárních metabolitů (48) : cholesterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, 4-hydroxy-digitolutein, tyto hladiny byly ale velmi nízké a během pasážování se dále také snižovaly.

Na rozdíl od syntézy *de novo* se z komerčního hlediska zdá být daleko slibnější proces biotransformace. Graves a Smith (49) zjistili, že tkáňové kultury *D. lanata* a *D. purpurea* rychle transformovaly progesteron na pregnan a po přidání progesteronu do těchto kultur se hladina digitoxinu a digoxinu dále zvyšovala. Stohs a Staba při studiu biotransformačních reakcí kardenolidů pomocí rodu *Digitalis* připustili výskyt glykosylační reakce.

Mezi mnohými studiemi, které byly provedeny je pro možnou komerční výrobu velmi důležitý fakt, že na srdeční choroby má větší terapeutický efekt podávání digoxinu, než digitoxinu. Je tedy výhodné, že listy náprstníku obsahují větší množství digitoxinu, který tak může posloužit jako substrát pro biotransformaci na digoxin, protože v poloze 12- β dochází k hydroxylaci. Biotransformaci β -metyldigitoxinu na β -metyldigoxin s použitím buněk *D. lanata* zkoumali Reihard a Alfemann (50) v Německu od roku 1974. Výtěžek byl po 17 dnech okolo

600-700 mg β -metyldigoxinu na litr s využitím 200 litrového reaktoru. Tento proces byl studován pro komerční účely firmy Boehringer Mannheim Co.

3.4.3. L-dopa

L-dopa, tedy L-3,4-dihydroxyfenylalanin je důležitý zprostředkovatel sekundárního metabolismu vyšších rostlin a je také znám jako prekurzor alkaloidů, melaninu a jiných látek. U zvířat slouží jako prekurzor pro vznik katecholaminů a je dále užíván jako významný lék pro terapii Parkinsonovy choroby.

Brain v roce 1976 (51) zjistil, že tkáňová kultura *Mucuna pruriens* akumulovala 25 mg/l L-dopy a to v prostředí, které obsahovalo vysokou koncentraci 2,4-D. Witchers a kol. imobilizovali buňky *M. pruriens* v alginátu a zjistili, že buňky transformovaly L-dopu z tyrosinu v koncentraci až 2 % suché hmotnosti buněk. L-dopa byla ve většině vyloučena do média. Teramoto a Komamine (52) indukovali kalus z *Stizolobium hassjoo* (*Mucuna hassjoo*), *M. pruriens* a *M. deeringiana* a optimalizovali podmínky. Nejvyšší koncentrace L-dopy byla v nalezena u kultury *S. hassjoo*, která byla kultivována na médiu Murashige-Skooga obsahující 0,025 mg/l 2,4-D a 10 ml/l kinetinu. Hladina L-dopy byla v buňkách okolo 80 nmol/g.

3.4.4. Valepotriáty

Rostliny čeledi *Valerianaceae* byly odedávna užívány v lidovém léčitelství. Například *Nardostachys jatamansi*, *Valeriana wallichii* a *V. officinalis* L. var. *angustifolia* byly používány v Indii a *N. chinensis* zase v Číně po stovky let. Rostliny druhu *Partrinia* jsou užívány jako sedativa v Rusku. Ačkoliv přesné složení účinných látek těchto rostlin ještě neznáme, skupina sloučenin mající stejnou biologickou aktivitu jako sedativa, trankvilizéry, cytotoxickou a antineoplastickou aktivitu byly nazvány valepotriáty.

Becker a kol. (53) indukoval tkáňové kultury z devíti různých druhů rostlin čeledi *Valerianaceae* na MS médiu a zjistil, že buňky rostlin druhu *Fedia*

cornucopiae a *V. locusta* produkovaly větší množství sloučenin než intaktní rostliny. Soustředil se na izolaci buněčné linie rezistentní na trifluoroleucin a nystatin a za použití kolchicinu kultivoval buňky ve dvoufázovém médiu za dodání některých bioregulatorů. Na základě poznatku, že valepotriáty mají monoterpenovou kostru, je za jejich prekurzor považován leucin.

Becker a kol.(54) isolovali buněčnou linii z rostliny *V. wallichii* odolnou na leucinový analog trifluorleucin, ale množství valepotriátu v buňkách zvýšeno nebylo, přestože intracelulární hladina leucinu vzrostla. Bylo známo, že houby, které jsou rezistentní na polyenové antibiotikum nystatin, produkují velké množství steroidu. Jeden z druhů *V. wallichii* odolný také na nystatin zvýšil množství produkovaného valepotriátu až na trojnásobek, což znamenalo 88 mg/g sušiny. Dalším pokusem (55) bylo přidání regulačního mutagenu kolchicinu do suspenzní kultury *V. wallichii*, čímž došlo k indukci polyploidních buněk. Následkem toho buňky ovlivněné kolchicinem produkovaly vyšší množství valepotriátů, než buňky nezmutované. Po přidání látky RP-8 (Merk) do dvoufázové kultury došlo k sekreci lipofilních složek z buněk a celková produkce valepotriátů byla podstatně zvýšena.

K výraznému vzrůstu hladiny valepotriátů došlo u suspenzních kultur rostlin *Fedia cornucopiae* a *V. wallichii*, po přidání těchto bioregulatorů: dimethyl-morpholinium-bromid, dimethyl-piperidinium-bromid, dimethyl-piperidinium-chlorid a také 2-(3,4-dichloro-fenoxy)-triethylamin a 2-(3,5-diisopropylfenoxy)-triethylamin. Byly přidávány během ranných exponenciálně růstových fází v koncentracích 0,01 až 0,04 (55).

3.4.5. Sloučeniny s antineoplastickou aktivitou

Rostlinná říše je jedním z velmi atraktivních zdrojů nových antitumorových látek. Například The National Cancer Institute U.S.A. vedl velmi intenzivní screeningový program již od roku 1955 a identifikoval tak řadu silně účinných látek pocházejících právě z vyšších rostlin (56). Tyto protinádorové sloučeniny zahrnují

maytansin, triptiolid, homoharringtonin, bruceantin, ellipticin, thalicarpin, indicin-N-oxid a baccharin. Kromě těchto sloučenin jsou některé produkty vyšších rostlin jako: vinblastin, vincristin, deriváty podophyllotoxinu včetně etoposidu a camptothecinu a jejich deriváty používány jako velmi důležité antikancerogenní léčiva.

Taxol pocházející z *Taxus brevifolia* a příbuzných rostlin je pro léčbu podáván od roku 1992 a je to jedna z velmi účinných sloučenin. Problémem ovšem je, že koncentrace těchto aktivních komponentů v rostlinách je obecně velmi nízká a tempo růstu rostlin je pomalé. Hromadění těchto látek je navíc velmi citlivé na zeměpisných a ekologických podmínkách. Je proto ekonomicky velmi náročné vyrábět tyto sloučeniny extrakcí z intaktních rostlin, navíc se zde objevuje nový ekologický problém, například pro produkci taxolu by mohlo dojít k vyčerpání přirozeně rostoucích rostlin, což by mělo velký vliv na životní prostředí. I když procesy rostlinných tkáňových kultur ještě stále nejsou ekonomicky zcela efektivní, je snaha o výrobu takovýchto látek právě těmito cestami nepochybně správná. Navíc má mnoho antikancerogenních sloučenin izolovaných z rostlin velmi složitou chemickou strukturu jejíž syntéza by byla velmi složitá (27).

3.4.5.1. Kamptothecin

Camptotheca acuminata je rostlina původem ze severní Číny. V roce 1966 Wall a spol. (57) objevili produkci alkaloidu kamptothecinu touto rostlinou, který při pokusech na karcinosarkomu krysa a leukémii myši prokázal antineoplastický účinek. Klinické pokusy na pacientech s gastrointestinální rakovinou vypadaly z počátku velmi slibně, ale pak se kamptotecin ukázal jako velmi toxický.

Sakato a Misawa (58) založili tkáňovou kulturu z buněk stonku *C. acuminata* na pevném médiu dle MS s obsahem 0,2 mg/l 2,4-D a 1 mg/l kinetinu. Kalus byl poté přenesen do tekutého média. Buňky stimuloval gibberelin, L-tryptofan a další složky média. Po patnácti dnech kultivace v suspenzní kultuře dosáhlo množství kamptothecinu asi 0,0025 % v sušině, což odpovídá asi 1/20 množství, které se nachází v intaktní rostlině.

Hengel a kol.(59) založili v Holandsku suspenzní tkáňovou kulturu *C. acuminata* a kamptothecin detekovali pomocí TLC, HPLC a GC-MS. Největší množství látky, 0,998 mg/l, bylo nasyntetizováno v buňkách rostoucích na MS mediu a obsahující 4 mg/l NAA. 10-hydroxycamptothecin mající menší toxicitu, je slibný derivát kamptothecinu, který je klinicky zkoumán v U.S.A.

3.4.5.2. Homoharringtoniny

Homoharringtonin společně s harringtoninem a isoharringtoninem byly izolovány v roce 1969 Powellem a kol.(60) z rostliny *Cephalotaxus harringtonia*. Tyto alkaloidy jsou komplexem esterů inaktivního alkoholu cephalotaxinu. Tyto sloučeniny inhibují rozvíjení leukémie myši a homoharringtonin prokázal aktivitu v případě rakoviny tlustého střeva, melanomu a také leukémie u myši. Delfel a kol. (61) kultivovali kalus této rostliny a získali okolo 5-10 mg /kg suché hmotnosti alkaloidů za dobu 3 až 6 měsíců, což odpovídalo přibližně 1 až 3 % koncentrace v mateřské rostlině. Produkt obsahoval cephalotaxin, homoharringtonin, harringtonin a isoharringtonin. MS médium obsahující 1 mg/l kinetinu a 3 mg/l NAA příznivě ovlivňovalo vznik kalusu, zatímco médium bez růstových látek silně ovlivňovalo organogenezi (62, 63, 64).

3.4.5.3. Podophylotoxin

Podophyllum peltatum , běžná bylina, rostoucí v severní Americe obsahuje antitumorový lignin podofyllotoxin. Je používán při určitých virových onemocněních a rakovině kůže (65). Semi-syntetický derivát podofylotoxinu- etoposid byl shledán velmi účinným proti nádorům mozku, lymfosarkomu a Hodgkinově nemoci a je zpracováván jedním z největších výrobců léků U.S. Bristol-Myers Squibb.

O produkci podofyllotoxinu pomocí tkáňových kultur *P. pelatum* se poprvé pokusil Kadkade (66) a zjistil, že jeho nejvyšší hladiny byly při kombinaci 2,4-D a kinetinu v médiu a při osvětováním červeným světlem. Sakata a kol. (67) z Nippon

Oil indukovali kořeny z pevné tkáňové kultury této rostliny v tekutém médiu MS s přidavkem 1mg/l NAA, 0,2 mg/l kinetinu a 500 mg /l hydrolyzátu kaseinu. Poté byly kořeny přeneseny do média bez růstových regulátorů. Zde bylo detekováno 1,6 % podofylotoxinu v suchých buňkách, což je 6krát víc než v mateřské rostlině.

Pro zvýšení výnosu podofylotoxinu přidali Woerdenberg a kol. v Holandsku (68) k suspenzní kultuře *Podophyllum hexandrum* komplex prekurzorů: koniferylalkohol a β -cyklodextrin. Přidavkem 3mM komplexu koniferyl alkoholu získali 0,013% podofylotoxinu v sušině, zatímco buňky bez prekurzorů produkovaly jen 0,003%. β -D glykosid koniferylalkoholu, koniferin, byl jako možný prekurzor pro výrobu těchto antikancerovních látek slibnější (produkce 0,055%), ale bohužel je jako sloučenina komerčně nedostupný. Titíž autoři také zjistili, že suspenzní buněčná kultura *Callitris drummondii* akumuluje podofylotoxin- β -D glukosu. Ve tmě buňky produkují přibližně 0,02% podofylotoxinu v sušině, 85-90 % tohoto lignanu je právě ve formě β -D-glukosy, zatímco na světle výtěžek klesne na 0,11 %.

Heyenga (69) založil tkáňovou kulturu z *P. hexandrum* za přidání 2,4-D, kyseliny gibberelové a 6-benzylaminopurinu na médiu B5. Kultura produkovala 4'-demethyl-podofylotoxin, podofylotoxin a podofylotoxin-4-O-glykosid a to ve stejném množství jako matečná rostlina. Smooly a kol. (70) zjistili, že podofylotoxin také produkuje pevná i suspenzní buněčná kultura *Lilium album*. Jedna z buněčných linií produkovala po třech týdnech kultivace 0,3 % tohoto lignanu v suchých buňkách spolu s malým množstvím 5-methylpodofylotoxinu, lariciresinolu a pinoresinolu.

3.4.5.4. Alkaloidy rodu *Vinca*

Jedná se o skupinu více než 50 alkaloidů z rostlin rodu *Vinca*, které jsou užívané pro svůj mitostatický účinek, zejména jako cytostatika při Hodgkinově chorobě, různých typů leukémií a tumorů. Patří zde především vinblastin a vinkristin a dále například vindesin, vinkamin, a vinorelin.

Běžně jsou získávány extrakcí z rostliny *Catharanthus roseus* (Apocyanaceae), ale tento způsob není efektivní, protože obsah alkaloidů v rostlině je velmi malý.

Například koncentrace vinkristinu a vinblastinu je zde jen 0,0005 % v sušině. Misawa a jeho kolegové z Allelix Inc. v Kanadě (71) společně s Kurzem (72) z National Research Council of Canada a Kutneym (73) z University of British Columbia studovali produkci vinblastinu alternativní cestou založenou na ekonomicky výhodné výrobě katarantinu pomocí rostlinné buněčné fermentace a jednoduché chemické nebo enzymatické syntézy. Molekula vinblastinu se totiž skládá ze dvou monomerních alkaloidů a to katarantinu a vindolinu. Koncentrace vindolinu v intaktní rostlině *C. roseus* je přibližně 0,2 % sušiny, což je podstatně více než množství katarantinu a také cena je ve srovnání s vinblastinem i katarantinem nižší. Allelix group zkoumala rovněž možnou výrobu katarantinu pomocí suspenzní buněčné kultury s využitím selektované buněčné linie z prašníků *C. roseus* indukované na Gamborgově B5 médiu s obsahem 2 % sacharózy, 1 mg/l 2,4-D a 0,1 mg/l kinetinu. Buňky poté rostly ve 250 ml lahvích obsahujících 60 ml pevného média dle MS obohaceného 3% sacharózy, 1 mg/l NAA a 0,1 mg/l kinetinu, za stálého přístupu světla, stálého míchání a při teplotě 25° C. Výsledky prokázaly, že nejvhodnější médium pro produkci katarantinu je dle Murashige-Skooga, ale optimální množství fytohormonů pro růst a produkci je velmi variabilní v závislosti na rozdílnostech buněčných linií. Například některé linie ke svému růstu žádné fytohormony nepotřebovaly, některé vyžadovaly 0,1 mg/l NAA a 0,1 mg/l kinetinu. Jako stimulatory efektivity produkce se osvědčily některé chemické sloučeniny. Výrazné zvýšení produkce katarantinu nastalo po přidání vanadyl sulfátu, kyseliny abcisové a NaCl. Smart a kol. (74) pozorovali, že po přidání kyseliny abcisové jako elicitoru 7.den kultivace do fermentátoru vzrostla konečná hodnota katarantinu na 85 mg/l.

Druhým důležitým úkolem Allelix's group bylo nalézt možný enzymaticky nebo chemický způsob vazby katarantinu, vyrobeného pomocí buněčných kultur, a vindolinu, který je komerčně dostupný. Jako zdroj enzymů pro reakci sloužil precipitát z kultur *C. roseus*, který obsahoval 70 % síranu amonného. Reakční směs obsahovala oba monomerní alkaloidy, pufr (pH 7) a enzymový preparát, vše bylo inkubováno po tři hodiny při 30° C. Enzymatická reakce dávala řadu dimerních alkaloidů včetně vinamidinu, 3-(R)-hydroxyvinamidinu a 3'4'-anhydrovinblastin. V ranných fázích reakce byly také nalezeny oxidační deriváty anhydrovinblastinu, leurosin a catharin. Ačkoliv nebyl nalezen ani vinblastin ani vinkristin, vědci

pozorovali, že po přidání boridu sodného do směsi po skončení reakce, dojde k výraznému zvýšení množství anhydrovinblastinu.

Tyto studie vazebných mechanismů ukázaly velmi důležitý poznatek, vědci zjistili, že železnatý iont za nepřítomnosti enzymu silně katalyzuje syntetickou reakci. Zajímavé je, že potom nebyl produktem jen anhydrovinblastin, ale i vinblastin, a to při popsané inkubaci v množství 52,8 a 12,3 %. Jejich identifikace byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Tato efektivní metoda produkce vinblastinu byla firmou Mitsui Petrochemicals Industry dále vyvíjena se snahou o komerční využití. Hara a kol.(75) zde zvýšil výtěžek catharantinu až na 150 mg/l na MS médiu doplněného o 1 mg/l NAA a 0,1 mg/l kinetinu a s využitím nejlepších produkčních buněčných linií. Výnos vinblastinu se také zvýšil po přidání chloridu železitého, šťavelanu, maleátu a borhydrátem sodným, čímž došlo ke stimulaci výtěžku až na 50 % (76).

Bede a kol. (76) se dále zabývali výzkumem anhydrovinblastinu za použití komplexu dvou enzymů – peroxidázy z křenu selského a glukozové oxidázy (glucose oxidase), které měly katalyzovat tvorbu anhydrovinblastinu z catharantinu a vindolinu. Ačkoliv peroxidáza vyžaduje pro vznik vazebné reakce (syntézy) peroxid vodíku, pokud je přítomen v reakční směsi v nadbytku, může reakci inhibovat. Přidáním glukosové oxidázy dojde k nepřerušovanému řízenému uvolňování peroxidu v nízkých dávkách za minimálních oxidačních reakcí.

3.4.5.5. Taxol

V rámci rozsáhlého screeningového programu NCI, se v roce 1965 podařilo Waal a kol. (77) získat ze stromu *Taxus brevifolia* základní směs látek aktivních proti tumorovým buňkám. Jako první v roce 1965 isoloval čistý taxol, jehož přesná chemická struktura byla odhalena o tři roky později. Jde o diterpen, který se ukázal být velmi účinný proti myším melanomu, lidskému nádoru prsní mléčné žlázy a tlustého střeva. Mechanismus účinku je specifický, spočívá ve stabilizaci mikrotubulu, tím zabraňuje depolymerizaci a dochází k inhibici mitózy (78). Klinické pokusy začaly v roce 1983 a mají pozitivní výsledky v léčbě pokročilých

stádií rakoviny vaječníků a prsu. FDA v USA schválilo použití taxolu (genericky známý jako paklitaxel) v roce 1992 a firma Bristol-Myers Squibb ho vyrábí jako léčivo používané při léčbě rakoviny ovaríí, kde selhaly jiné druhy chemoterapií. Taxol je nyní průmyslově vyráběn extrakcí z divoce rostoucího stromu *T. brevifolia*. Požadavky na množství taxolu budou jistě vzrůstat, protože je úspěšně aplikován i při léčbě rakoviny prsu a plic. Množství taxolu je ale omezené, přesto že se vyskytuje i v jiných rostlinách, například *T. canadensis* a *T. cuspidata* jeho koncentrace je obecně ve všech rostlinách rodu *Taxus* velmi nízká a proto je velkým problémem pro životní prostředí rozsáhlé kácení těchto stromů.

Jako alternativní cesta se tedy nabízí rostlinné tkáňové a buněčné kultury, chemická přeměna vycházející z baccatinu, získávaného z jehličí těchto stromů (79) a celková chemická syntéza *de novo*. Tyto výzkumy tak zaujaly mnoho vědců. V U.S.A., Phyton Catalytic Inc. a ESCAgenetics před několika lety oznámili průmyslovou výrobu taxolu pomocí rostlinných tkáňových kultur a dokonce předložili několik fotografií s ampulkami obsahujícími taxolový prášek, ale nikdy, ani jedna ze společností, nepublikovala detaily o těchto rostlinných tkáňových kulturách ani v odborných časopisech ani na odborných konferencích. Například Christen a kol. (80) si nechali patentovat tkáňovou kulturu rostliny *T. brevifolia*, která úspěšně produkovala taxol a příbuzné alkaloidy a jejich prekurzory, ale patentové nároky jsou mimořádně široké a skutečný postup se nedá přesně zjistit. Shuler a kol. (81) na Cornellově univerzitě doložil, že suspenzní buněčná kultura *T. brevifolia* produkovala do média 3,9 mg/l taxolu po 26 dnech kultivace. Množství taxolu bylo detekováno pomocí HPLC.

Dále tito autoři zjistili, že po naočkování buněk do média se jejich hmotnost zčtyřnásobila a taxol se poprvé objevil po 13ti dnech kultivace, přičemž jeho hodnota výrazně vzrostla po 20ti dnech. Zajímavé je, že všechny typy producentů taxolu vylučovaly tuto látku do média, což je pro rostlinné tkáňové kultury velmi neobvyklé. Wickremansinhe a Arthea (82) na Pensylvánské univerzitě založili pevné a suspenzní tkáňové kultury z rostlin *T. brevifolia* cv Repandens, *T. cuspidata*, *T. media* cvs Hicksii a Densiformis. Ačkoliv některé buněčné linie rostly rychleji, hladiny taxolu byly pro komerční využití velmi nízké, přičemž zkoušeli i využití „hairy roots“ těchto rostlin (83).

DiCosmo a jeho kolegové (84) na univerzitě v Torontu ve spolupráci s japonskou firmou Nippon Oil Co. Ltd. popsali, že objevili a identifikovali taxol v kalusové tkáňové kultuře *T. cuspidata* a jeho množství po 2 týdenní kultivaci bylo okolo 0,02 % v sušině. Další suspenzní tkáňová kultura byla založena z této kalusové kultury a postupně byla imobilizována na podložku ze skleněných vláken. Buňky byly v této imobilizované formě kultivovány po dobu 6 měsíců. Zde se hodnota taxolu pohybovala okolo 0,012 % v sušině. Taxol je pro svou vysokou cenu a velkou poptávku jeden z nejžádanějších produktů námi zkoumaných rostlinných tkáňových kultur. Bristol-Myers Squibb proto financuje mnoho výzkumných skupin, zabývajících se produkcí taxolu rostlinnými tkáňovými kulturami.

3.4.6. Ginsenosidy

Kořeny vytrvalé byliny *Panax ginseng* nazývané „žen-šen“ byly široce využívány jako tonizující a drahocenná medicína již od starověku, a to především ve východních zemích včetně Korey a Číny. Pomáhá proti gastroenterickým chorobám, diabetu, srdeční nedostatečnosti a také jako preventivní lék řady dalších onemocnění. Tak byl žen-šen uznán jako zázračný lék pro zachování zdraví a dlouhověkost. Bylo známé, že kořen obsahuje řadu saponinů a sapogeninů. Mezi nimi například ginsenosid-Rb má sedativní vlastnosti, zatím co Rg má povzbuzující účinky. Přesto že je několik druhů rodu *Ginseng*, komerčně využitelné jsou druhy rostoucí v oblasti 30-48° severní zeměpisné šířky jako Korea (85). Vypěstování žen-šenu na poli trvá přibližně čtyři až sedm let a je nemožné jej pěstovat nepřetržitě 20 až 50 let, poptávka ve světě ale stoupá a tím se dramaticky zvyšuje jeho cena. To je také důvod proč se dnes mnoho vědců zabývá myšlenkou produkovat ginsenosidy pomocí rostlinných tkáňových kultur.

Furuya a kol. (86, 87) na Kotasi Univerzitě studuje tkáňovou kulturu *P. ginseng* již od roku 1970. Společnost Meiji Seika Kaisha v Japonsku dále rozvíjela tyto poznatky za použití různých typů fermentorů a podle patentu podaného v roce 1973 (88) mohou „crown gall“, kalusy a rediferencované kořeny rostliny *P. ginseng* akumulovat saponiny a sapogeniny známé z intaktních rostlin. Tkáňové i kořenové kultury byly kultivovány na pevném i tekutém médiu dle MS s obsahem vitamínů,

sacharózy, 2,4-D a další přírodních živin jako sojový prášek nebo vepřový extrakt, po několik týdnů při teplotě 25-28° C. Koncentrace surového saponinu byla v kalusové kultuře 21,1 %, v „crown gall“ 19,3 % a v rediferencovaných kořenech 27,4 %, což je podstatně více než v přírodních kořenech (4,1 %). Saponiny obsahovaly ginsenosid- Rb a Rg. Pro získání buněk, které by saponiny produkovaly ve vysokém množství (saponin-vysoce produkční buňky) bylo použito mutagenese s využitím nitrosoguanidinu a γ -paprsků. Varianta buněčné linie z „crown gall“ indukovaná γ -zářením akumulovala 25,5 % saponinů.

Staba (89) z univerzity Minnesota také získal buněčné kultury rostliny *P. ginseng* obsahující ginsenosidy. Choi z Korea Ginseng & Tobacco Research Institute (85) se zabýval vlivem růstových regulátorů na hladiny saponinů v pevných i suspenzních tkáňových kulturách. Například v tkáňové kultuře kultivované na MS médiu obsahující 5 mg/l 2,4-D a 1 mg/l kinetinu bylo zjištěno 3,62 % saponinů, zatímco totéž médium s přídavkem 10 mg/l 2,4-D a 1 mg/l kinetinu produkovalo 8,78 % saponinů.

Ushiyama a kol.(90) v další japonské společnosti Nitto Denko Corporation, která převzala výzkum od Meiji Seika Kaisha, prováděli optimalizaci podmínek fermentace za použití třiceti litrových fermentačních lahví pro buněčné linie diferencovaných tkáňových kultur původně indukovaných Furuya a kol. (86, 87) . V počátečních stupních kvašení sacharóza povzbuzovala buněčný růst a po nasycení během růstového cyklu stimulovala produkci saponinů. Ačkoliv vyšší poměr NO_2/NH_3 byl příznivý pro růst, snižoval koncentraci saponinů v buňkách. Celkový výtěžek saponinů byl ale zvýšený. Největší množství bylo 19 g /l v sušině a průměrná produkce byla přibližně 700 mg/l za den. Ushiyama (90) dále konstatoval, že rostlinné tkáňové kultury *P. ginseng* obsahují v zásadě stejné obsahové látky jako intaktní rostlina. Akutní virulentní test, Amesův test a 6 měsíční dietetické testy s krmivem pro dobytek, které obsahovalo 12,5 % sušených buněk této tkáňové kultury, neukázaly u zvířat žádné abnormality. V roce 1988 získala tato společnost povolení od ministerstva zdravotnictví v Japonsku prodávat žen-šenové tkáňové kultury jako potravinový doplněk. Tento výrobek byl užíván jako přísada do vína, tonizujících nápojů, polévek, bylinných likérů a podobně.

3.4.7. Kyselina rozmarýnová

Kyselina rozmarýnová, přesněji α -[[3-(3,4-dihydroxyfenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-3,4-dihydroxy-benzenpropanová kyselina byla nalezena v rostlinách čeledi *Lamiaceae* a *Boraginaceae*. Tato kyselina a některé další jí příbuzné látky jsou fyziologicky nebo farmakologicky účinné. Oxidovaná rozmarýnová kyselina vykazovala antithyreotropní aktivitu a samotná kyselina testovaná na králících efektivně potlačovala endotoxinový šok (91).

Buněčné kultury rostlin *Coleus blumei* (92), *Anchusa officinalis* (92) a *Lithospermum erythrorhizon* (93) jsou schopné produkovat rozmarýnovou kyselinu, dále jen RK. Zajímavé je, že množství kyseliny je vysoké a je stálé. Ellis uvedl, že tkáňová kulturu *C. blumei* produkovala RK stabilně po dobu 10 let, bez sebemenšího poklesu výnosu. Nediferencované buněčné kultury *C. blumei* a *A. officinalis* akumulovaly téměř výhradně RK a to ve vyšším množství než se nachází v intaktní rostlině, přičemž obě buněčné kultury byly kultivovány na Gamborg-Eveleigh B5 médiu. Před optimalizací růstových podmínek byl výtěžek 1,4 g/l RK u *C. blumei* a 0,7 g/l u *A. officinalis* (92). Oba druhy rostlin dosáhly množství až 16 g suchých buněk na litr a to během kultivační periody 30-40 hodin. Zenk a kol. (94) popsal stimulaci růstu i produkce RK v buněčné kultuře *C. blumei* pomocí postupně zvyšované koncentrace sacharózy až do 7,5 % na B5 médiu. Výnosnost kyseliny byla přibližně 3,6 g/l a buněčná masa představovala 27 g suchých buněk na litr, což je jeden z největších zisků sekundárních metabolitů produkovanými tkáňovými kulturami vůbec.

De-Eknamkul a Ells (92) sledovali korelace mezi růstem buněk a produkcí kyseliny rozmarýnové. Použili obě zmiňované buněčné kultury a vyzorovali, že v případě *C. blumei* mělo větší efekt použití 2,4-D, zatím co u *A. officinalis* se osvědčilo dodávat do média NAA.

Pro přesné určení místa akumulace RK a biosyntézy enzymů v buňkách, zvolili Alfermann a jeho kolegové (95) metodu preparace buněčných protoplastů z buněčné kultury *C. blumei*. RK byla stejně jako její enzymy nalezena hlavně ve vakuolách buněk. Nedávno také Mizukami a Ellis (96) isolovali tři isoformy tyrosin transferázy (TAT) a to v suspenzní buněčné kultuře rostliny *A. officinalis* a dále zjistili, že dva

z těchto tří enzymů (TAT-1, TAT-4) jsou zapojeni do syntézy rozmarýnové kyseliny. Domnívají se, že TAT-1 zapříčiňuje konverzi tyrosinu na 4-hydroxyfenyl pyruvát a TAT-4 se účastní formace tyrosinu na fenylalanin.

Přesné rozpoznání cesty biosyntézy sekundárních metabolitů bude nepochybně přispívat k dalšímu zlepšení produkce buněk použitím rekombinantní DNA. Tato technologie bude v budoucnu jistě široce využívána. Ulbrich a kol.(97) ve firmě A. Nattermann & Cie. GmbH v Německu zkoumal hromadnou výrobu kyseliny rozmarýnové pomocí buněčné kultury *C. blumei*. Speciálně sestrojenými míchadly provzdušňoval médium, potom bylo 30-50 % z inokula *C. blumei* přesazeno do výrobního fermentoru, kde bylo jako produkční médium použito roztoku sacharózy v množství 50 g/l. Použitím tohoto postupu vzrostl výtěžek RK na 910 mg/l/den což představuje 21 % hmotnosti sušiny. Ulbrichův experiment tak potřebuje jen 14 dní na výrobu 200 g kyseliny rozmarýnové o čistotě 97 %.

3.4.8. Arbutin

Arbutin je široce rozšířená látka v různých rostlinách čeledi *Ericaceae* jako *Arctostaphylos uva-ursi* a *Vaccinium vitis-idaea*. Množství arbutinu v kůře *Pyrus communis* dosahuje až 28 %. *Arctostaphylos uva-ursi* je používána při chorobách močových cest jako desinficiens a její hlavní účinná látka, kterou je právě arbutin prokázal supresivní účinek na syntézu melaninu v lidské kůži (98). Japonská kosmetická společnost Shiseido přidává arbutin do celé řady svých produktů jako prevenci proti vzniku pigmentových skvrn na kůži.

Ačkoliv je arbutin komerčně dostupný chemickou syntézou, vědci společnosti Shiseido zkoumali alternativní postupy jeho získávání použitím rostlinných buněčných kultur včetně biotransformace (99).

Tabata a kol. (100) zjistili, že pěstované buňky *Datura innoxia* mají pozoruhodně vysokou schopnost glykosylovat hydrochinon na arbutin. Hydrochinon byl zcela konvertován na arbutin po 10 hodinách od jeho přidání do média. Glykosylace je katalyzována enzymem, uridindifosfátglukosou (UDPG)-

hydrochinon glukosyltransferasou. Yokoyama a kol. (99) vyseletovali buňky *C. roseus* jako producenty enzymu, které efektněji přeměňují hydrochinon, přidávaný do média na arbutin.

Dále optimalizovali některé komponenty v Linsmaier-Skoogově základním médiu pro produkci arbutinu a zjistili, že vyšší hodnoty sacharózy, až do 6%, dávají větší výtěžky arbutinu. Yokohama v tomto případě předpokládá, že sacharóza zde působí jako jakýsi pohlcovač volných radikálů a tím chrání buňky kultury před poškozujícím účinkem hydroxilových radikálů substrátu. Toto tvrzení také podporuje jejich další objev, že některé antioxidanty jako kyselina askorbová, gallová, cystein, tannin a kyselina fytová zvyšují hladinu arbutinu.

Podle Yokoyamy (99) chemická syntéza de novo vyžaduje nejméně tři postupné reakční kroky a výrobní cena arbutinu, získaného pomocí rostlinných buněčných kultur je srovnatelná s chemickým procesem. Biotransformace je jeden z nejlépe proveditelných procesů v rámci průmyslové aplikace rostlinných tkáňových a buněčných kultur. Výhodné je, že výnosnost arbutinu je vysoká, přičemž cena hydrochinonu jako substrátu je velmi přijatelná.

4. Experimentální část

4.1. Přístroje

Laboratorní analytické váhy AND HELAGO s.r.o.

Přesné váhy KERN 572

Horkovzdušný sterilizátor CHIRANA IP 21

Box s laminárním prouděním Holten LaminAir (HV MINI)

Sušárna MEMMERT

Silufol® UV 254 sklárny KAVALIER, závod Votice

UV lampa CAM AG

UV/VIS detektor PU 4110 Philips

Multichannel detektor DAD PU 4021 Philips

Pumpa PU 4110 Philips

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

Kolona 250 x 4 mm Purospher Star RP-18 endcapped, velikost částic 5 μm (Merck, Darmstadt)

4.2. Chemikálie

2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, Merck

N⁶-benzyladenin, Merck

4-methoxyfenol, Fluka AG

Kyselina p-kumarová, Sigma-Aldrich

Arbutin pro laboratorní účely, Roth

Methylarbutin izolovaný na katedře

Hydrochinon p.a., Lachema

Kyselina 4-hydroxybenzoová krist.reinst(cryst.research grade), Serva

4-aminoantipyrin čistý, Chemapol

Hexakvanoželezitan draselný p.a., Lachema

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

Methanol p.a., Lachema

Chloroform p.a., Lachema

Methanol gradient grade for liquid chromatography

Ethanol 96 %

SAVO, Bochemie
Chlorové vápno, Drogerie Tržický
Glycin p.a., Lachemie
Kyselina nikotinová čistá, Lachema
Thiamin hydrochlorid B.P., U.S.P., Koch-Light Laboratories Ltd
Pyridoxin hydrochlorid DAB 6, Loba Chemie
L-tyrosin, Serva
Kyselina chlorovodíková, Lachema
Myo-inositol, Sigma
Hydrolyzát kaseinu, Sigma
Sacharosa p.a., Lach-Ner
Agar noble difco laboratories, Detroit

4.3. Použitý biologický materiál a zakládání kultur

Pro založení tkáňové kultury byly použity mladé lístky *Centella asiatica* dodané ze zahrady léčivých rostlin. K desinfekci výchozího rostlinného materiálu (úžlabní pupeny a listy) bylo postupně použito :

1. ethanol 70 % (3 min)
2. destilovaná voda
3. chlorové vápno 10 % (20 min)
4. destilovaná voda
5. Savo 10 % (20 min)
6. destilovaná voda

Ke kultivaci kultur byla použita půda dle Murashigeho a Skooga (101) s přídatkem 0,5 mg/l 2,4 D a 0,5 mg/l BA (102).

4.4. Biotransformační pokusy

Pro pokusy s prekurzory byla použita můstková metoda s přidavkem růstového regulátoru 0,5 mg/l 2,4-D a 0,5 mg/l BA, na kterém byla kultura udržována. Po třech týdnech kultivace byly do živné půdy přidávány sterilně prekurzory, a to vždy ve dvou koncentracích:

Hydrochinon (100 mg/l), (200 mg/l)

Tyrosin (100 mg/l), (200 mg/l)

Kyselina 4-hydroxybenzoová (100 mg/l), (200 mg/l)

Kyselina p-kumarová (100mg/l), (200 mg/l)

Odběry vzorků kalusů pro analýzu byly provedeny po 6, 24 a 168 hodinách (tedy 1 týdnů). Analýzy byla prováděny rovněž u slepých pokusů (bez přidání prekurzoru) a vzorků živných médií.

4.5. Analýza obsahových látek

Příprava extraktu

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

TLC (Thin-Layer Chromatography):

Analýza byla provedena na deskách Silufol® a Silikagel 60 Merck.

Vyvíjecí soustava: chloroform : methanol (75: 25)

Detekce:

- 1) Postupný postřik:
4-aminoantipyrinem (4-AA) 0,02 M vodný roztok,
20 % vodným roztokem amoniaku ,
1 % vodným roztokem $K_3Fe(CN)_6$,
- 2) Postřik směsí 1% ethanolického roztoku $FeCl_3$ a 1% vodného roztoku $K_3Fe(CN)_6$.

Po vyvinutí chromatogramu byla před detekcí methylnarbutinu prováděna hydrolyza postřikem 1M HCL a 15 min zahřátím v sušárně při 105°C a pak alkalizace 10% amoniakem.

Standardy: Methanolické 0,1% roztoky hydrochinonu, arbutinu, methylnarbutinu, 4-methoxyfenolu

HPLC (Hight Performance Liquid Chromatography)

Specifikace přístroje:

pumpa: PU 4110

detektor: PU 4110 UV/VIS

DAD PU 4021 multichannel detektor

nástřiková klička: 20 μ l, manuální nástřik

kolona: 250 x 4 mm SGX C18, velikost částic 7 μ m (Merck)

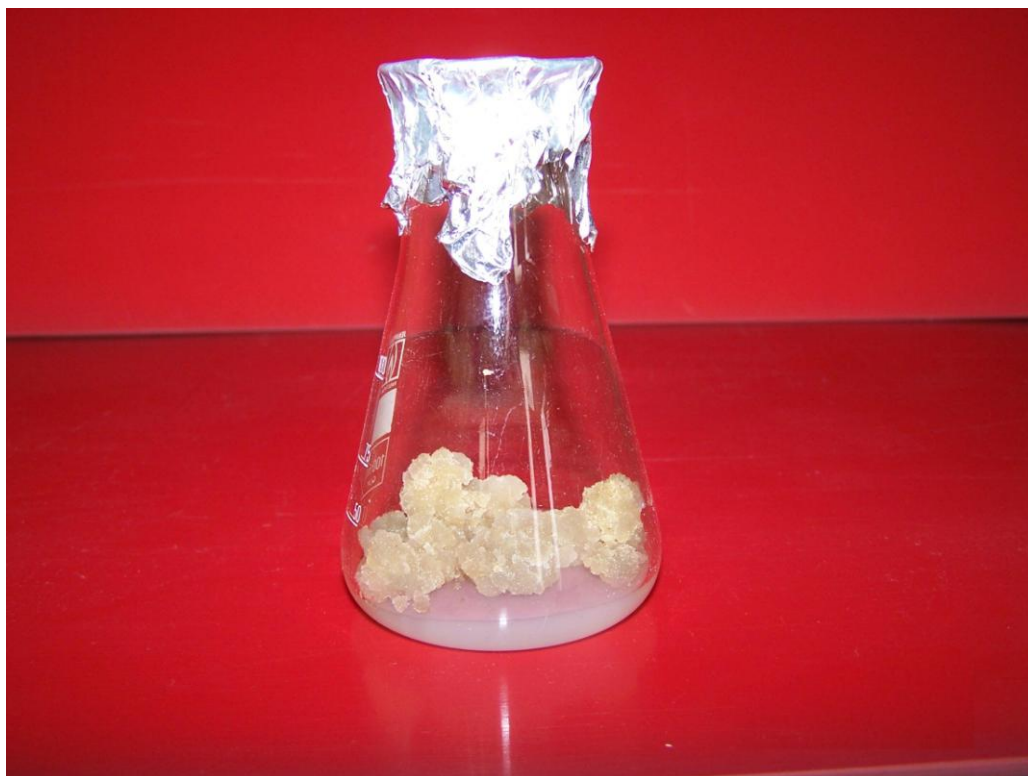
předkolona: 30 x 3 mm CGC SGX C18, velikost částic 10 μ m (Merck)

Vzorky byly rozpuštěny v 1 ml methanolu.

Analýza:

- eluce gradientová, methanol : voda v poměru 5 : 95 s lineárně se zvyšujícím poměrem methanolu až na poměr 95 : 5 v průběhu 15 min
- průtoková rychlost mobilní fáze 1,5 ml/min
- nástřik 20 μ l
- detektor UV/VIS PU 4110, monitorovaná vlnová délka 285 nm

5. Výsledky



Obr. 4 Tkáňová kultura *Centella asiatica*



Obr.5 Tkáňová kultura *Centella asiatica* –můstková metoda

Seznam zkratk použitých v tabulkách:

A.....arbutin

MA.....methyларbutin

PMF.....4-methoxyfenol

H.....hydrochinon

+.....sledovaná látka prokázána v půdě

-.....sledovaná látka neprokázána v půdě

x.....neznámá látka

5.1. Výsledky TLC analýzy

Tab. 1 Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci *Centella asiatica* po přidání prekurzorů hydrochinonu a kyseliny p-kumarové v koncentraci 100 mg/l

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	+	-	-	-	-	-	-	-
24 h	+	-	-	-	-	-	-	-
168 h	+	-	-	-	-	-	-	-
prekurzory	hydrochinon				kyselina p-kumarová			

Tab. 2 Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci *Centella asiatica* po přidání prekurzorů kyseliny 4-hydroxybenzoové a tyrosinu v koncentraci 100 mg/l

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
168 h	-	-	-	-	-	-	-	-
prekurzory	kyselina 4-hydroxybenzoová				tyrosin			

Tab. 3 Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci *Centella asiatica* po přidání prekurzorů hydrochinonu a kyseliny p-kumarové v koncentraci 200 mg/l

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	+	-	-	-	-	-	-	-
24 h	+	-	-	-	-	-	-	-
168 h	+	-	-	-	-	-	-	-
prekurzory	hydrochinon				kyselina p-kumarová			

Tab. 4 Výsledky TLC analýzy půd pro kultivaci *Centella asiatica* po přidání prekurzorů kyseliny 4-hydroxybenzoové a tyrosinu v koncentraci 200 mg/l

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
168 h	-	-	-	-	-	-	-	-
prekurzory	kyselina 4-hydroxybenzoová				tyrosin			

Tab. 5 Výsledky TLC analýzy extraktů kalusů *Centella asiatica* po přidání prekurzorů hydrochinonu a kyseliny p-kumarové v koncentraci 100 mg/l
Chyba! Chybné propojení.

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
168 h	-	+	-	-	-	-	-	-
prekurzory	hydrochinon				kyselina p-kumarová			

Tab. 6 Výsledky TLC analýzy extraktů kalusů *Centella asiatica* po přidání prekurzorů kyseliny 4-hydroxybenzoové a tyrosinu v koncentraci 100 mg/l

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
168 h	-	x	-	-	-	-	-	-
prekurzory	kyselina 4-hydroxybenzoová				tyrosin			

Tab. 7 Výsledky TLC analýzy extraktů kalusů *Centella asiatica* po přidání prekurzorů hydrochinonu a kyseliny p-kumarové v koncentraci 200 mg/l

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	-	+	-	-	-	-	-	-
168 h	-	+	-	-	-	-	-	-
prekurzory	hydrochinon				kyselina p-kumarová			

Tab. 8 Výsledky TLC analýzy extraktů kalusů *Centella asiatica* po přidání prekurzorů kyseliny 4-hydroxybenzoové a tyrosinu v koncentraci 200 mg/l

Doba odběru	Sledované látky				Sledované látky			
	H	A	MA	PMF	H	A	MA	PMF
6 h	-	x	-	-	-	-	-	-
24 h	-	x	-	-	-	-	-	-
168 h	-	-	-	-	-	-	-	-
prekurzory	kyselina 4-hydroxybenzoová				tyrosin			

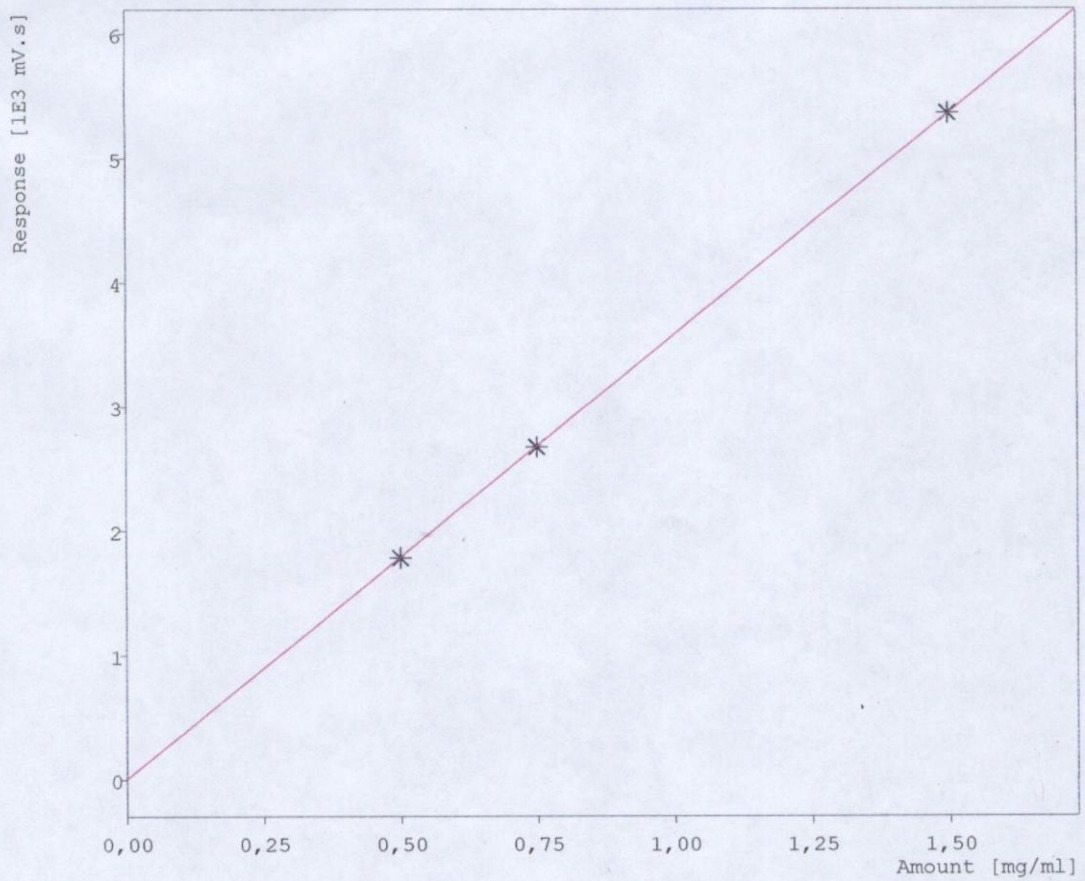
5.2. Výsledky HPLC analýzy extraktů kalusu *Centella asiatica*:

arbutin - 3,617 min.

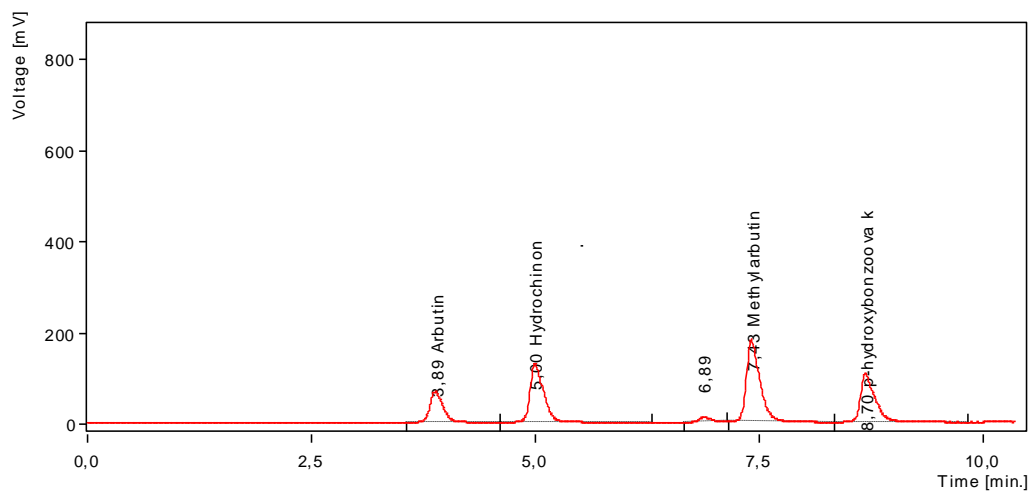
Peak Type : **Ordnr**
 Left Window : **0,4 min.**
 Right Window : **0,4 min.**
 Response Base : **Area**
 Curve Fit Type : **Linear**
 Zero Type : **Curve from Zero**
 Subst. Equation : **Y = 3572,66 * X**
 Correlation Coef. : **0,999996**
 Saved Resp. Fact. : **0**

Substance Levels

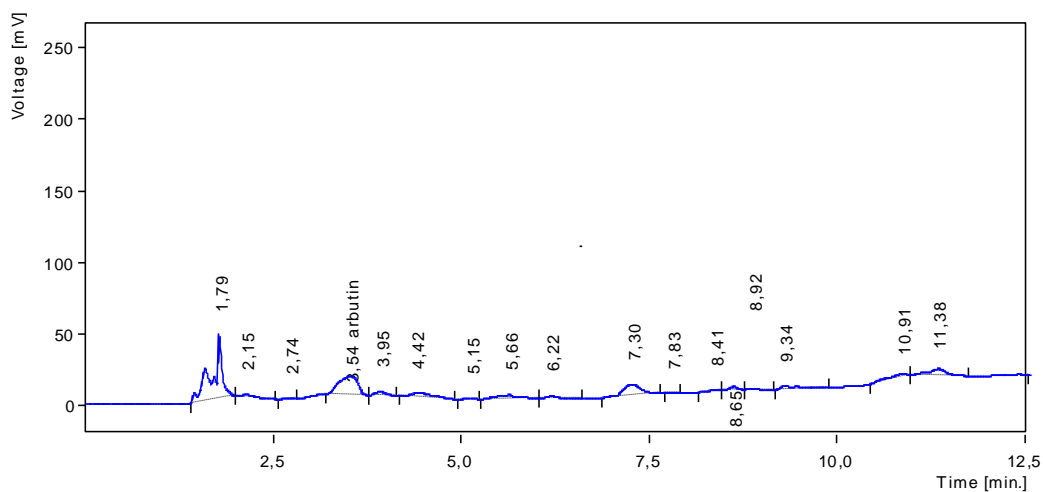
Lv	Response	Amount	Lvl Res Factor
1	5364,8548	1,500	2,8E-04
2	2670,6920	7,500E-01	2,8E-04
3	1781,9751	5,000E-01	2,8E-04
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0



Obr.6 Kalibrační křivka HPLC arbutinu

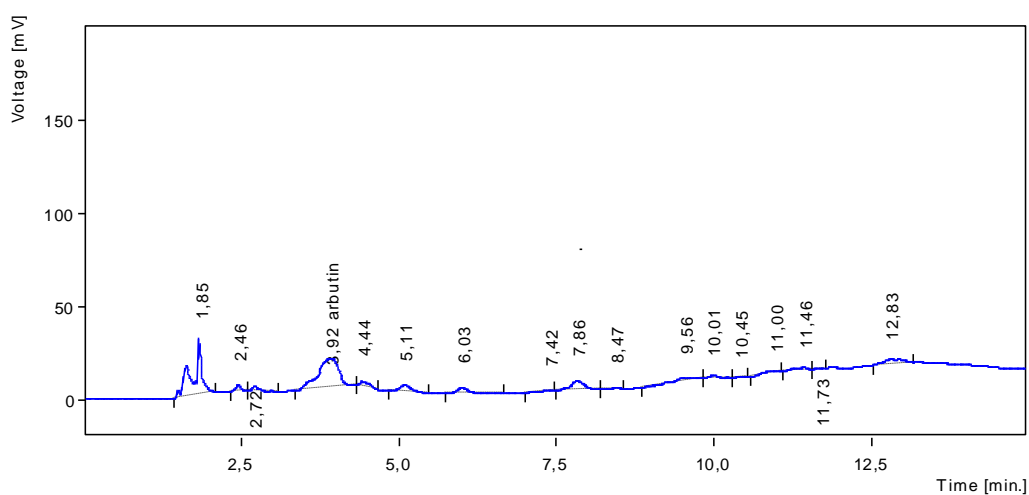


Obr.7 HPLC analýza standardů – arbutinu, methylarbutinu, hydrochinonu a kyseliny 4-hydroxybenzoové



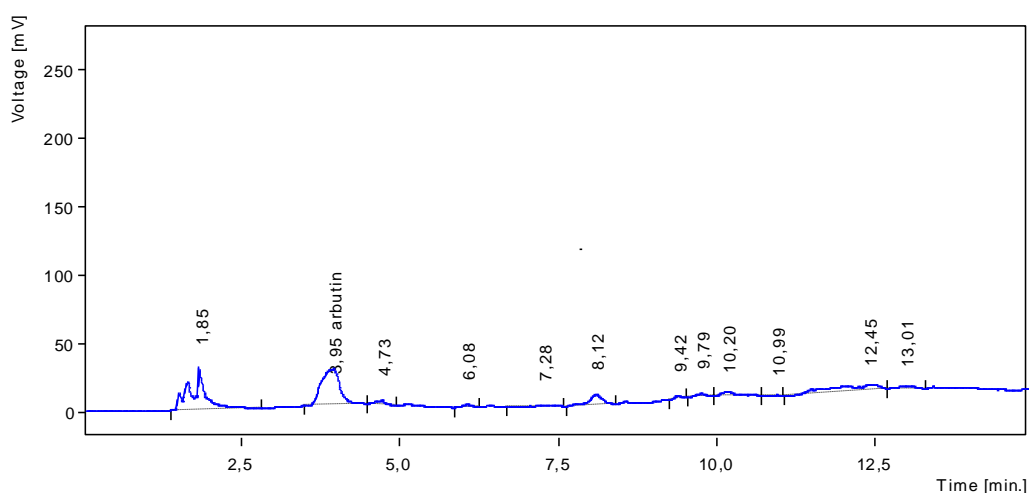
Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,79	413,3413	0	0		
2	2,15	19,9084	0	0		
3	2,74	3,0104	0	0		
→ 4	3,54	232,2271	0,1418	6,506	Ordnr	arbutin
5	3,95	28,4818	0	0		
6	4,42	66,0889	0	0		
7	5,15	2,9309	0	0		
8	5,66	54,5497	0	0		
9	6,22	15,154	0	0		
10	7,3	133,6869	0	0		
11	7,83	4,0126	0	0		
12	8,41	4,9069	0	0		
13	8,65	16,8295	0	0		
14	8,92	7,1933	0	0		
15	9,34	46,1533	0	0		
16	10,91	41,9918	0	0		
17	11,38	92,6988	0	0		
18	14,3	5717,559	0	0		
19	17,4	2951,049	0	0		
-	Total	9851,774	2,18	6,506		

Obr. 8 HPLC arbutinu v extraktu kalusu *Centella asiatica* -
prekurzor hydrochinon 100 mg/l, interval odběru 168 hod., 13. pasáž-světlo



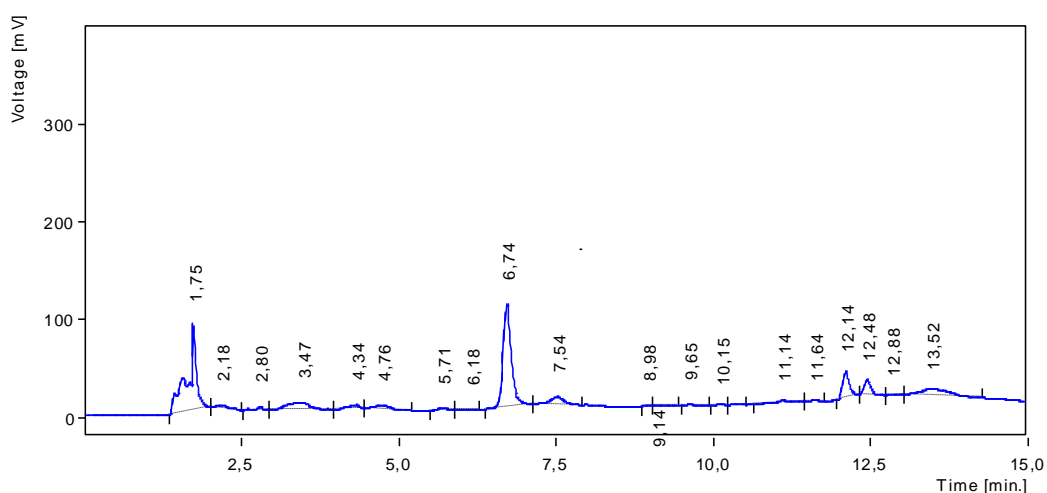
Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,85	283,7886	0	0		
2	2,46	20,4842	0	0		
3	2,72	19,9823	0	0		
→ 4	3,92	368,5085	0,3644	10,324	Ordnr	arbutin
5	4,44	32,1939	0	0		
6	5,11	52,4024	0	0		
7	6,03	43,8118	0	0		
8	7,42	4,1733	0	0		
9	7,86	77,2727	0	0		
10	8,47	5,2867	0	0		
11	9,56	40,4319	0	0		
12	10,01	15,8302	0	0		
13	10,45	4,0805	0	0		
14	11	18,4138	0	0		
15	11,46	18,7988	0	0		
16	11,73	1,7898	0	0		
17	12,83	52,7282	0	0		
-	Total	1059,977	3,53	10,324		

Obr. 9 HPLC arbutinu v extraktu kalusu *Centella asiatica* -
prekurzor hydrochinon 200 mg/l, interval odběru 24 hod., 17. pasáž-světlo



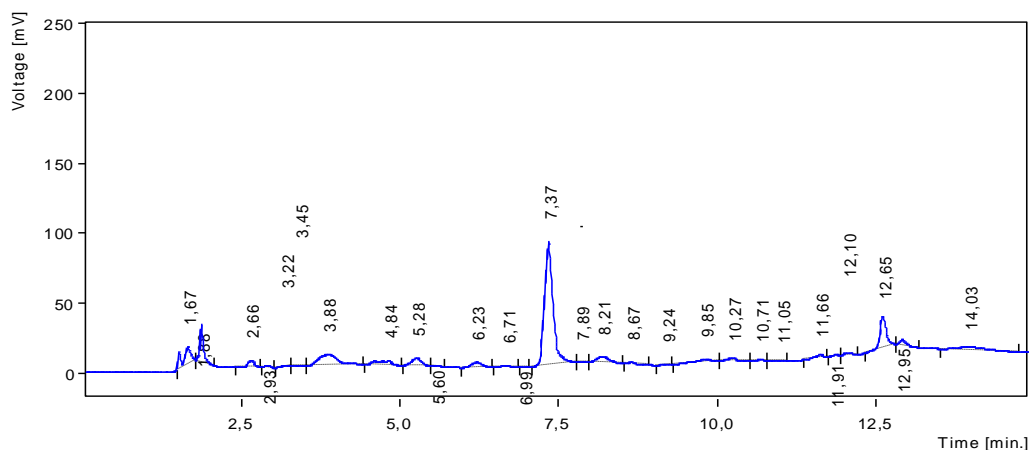
Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	1,85	479,6178	0	0		
→ 2	3,95	541,9075	0,504	15,181	Ordnr	arbutin
3	4,73	33,1249	0	0		
4	6,08	19,6624	0	0		
5	7,28	20,6029	0	0		
6	8,12	108,0599	0	0		
7	9,42	14,873	0	0		
8	9,79	25,9012	0	0		
9	10,2	52,4004	0	0		
10	10,99	7,3352	0	0		
11	12,45	241,0191	0	0		
12	13,01	32,6872	0	0		
-	Total	1577,192	3,32	15,181		

Obr. 10 HPLC arbutinu v extraktu kalusu *Centella asiatica* -
prekurzor hydrochinon 200 mg/l, interval odběru 168 hod., 17. pasáž-světlo



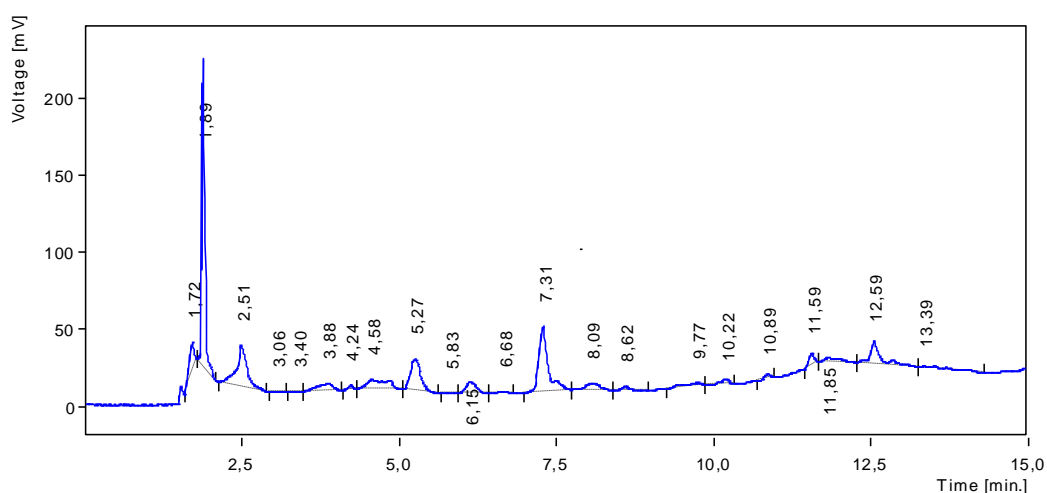
Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	1,75	865,4747	86,633	0,07	27,811	29,93
2	2,18	48,2296	3,39	0,2	1,55	1,171
3	2,8	24,9646	3,392	0,09	0,802	1,172
4	3,47	188,0183	6,851	0,44	6,042	2,367
5	4,34	51,7163	4,228	0,18	1,662	1,461
6	4,76	76,2053	4,293	0,3	2,449	1,483
7	5,71	26,6972	2,47	0,18	0,858	0,853
8	6,18	8,513	0,732	0,17	0,274	0,253
→ 9	6,74	986,5016	106,073	0,15	31,7	36,646
10	7,54	138,5008	8,447	0,24	4,451	2,918
11	8,98	4,8671	0,951	0,1	0,156	0,328
12	9,14	9,9883	0,714	0,21	0,321	0,247
13	9,65	17,4496	1,774	0,13	0,561	0,613
14	10,15	13,6123	1,657	0,14	0,437	0,572
15	10,36	9,2944	1,263	0,13	0,299	0,436
16	11,14	55,1989	2,76	0,4	1,774	0,953
17	11,64	17,283	1,924	0,16	0,555	0,665
18	12,14	206,8237	27,774	0,13	6,646	9,595
19	12,48	120,6628	16,305	0,12	3,877	5,633
20	12,88	9,4357	1,008	0,24	0,303	0,348
21	13,52	232,5064	6,814	0,54	7,472	2,356
-	Total	3111,943	289,452			

Obr. 11 HPLC neznámé látky v extraktu kalusu *Centella asiatica* - prekurzor PHB 100 mg/l, interval odběru 168 hod., 13. pasáž-světlo



Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	1,67	112,4997	13,043	0,12	5,961	6,363
2	1,88	100,4493	27,188	0,05	5,323	13,264
3	2,66	31,1834	4,569	0,11	1,652	2,229
4	2,93	10,3467	1,694	0,12	0,548	0,826
5	3,22	5,4245	0,599	0,14	0,287	0,292
6	3,45	1,8052	0,205	0,18	0,096	0,1
7	3,88	159,1866	7,449	0,34	8,435	3,634
8	4,84	54,5509	3,491	0,34	2,89	1,703
9	5,28	65,5429	5,865	0,19	3,473	2,861
10	5,6	4,6029	0,695	0,12	0,244	0,339
11	6,23	40,2462	3,606	0,18	2,133	1,759
12	6,71	8,0607	0,664	0,21	0,427	0,324
13	6,99	0,7243	0,169	0,09	0,038	0,083
→ 14	7,37	819,9334	88,608	0,14	43,446	43,228
15	7,89	2,6271	0,467	0,1	0,139	0,228
16	8,21	64,8713	4,473	0,23	3,437	2,182
17	8,67	10,6428	1,22	0,12	0,564	0,595
18	9,24	2,0788	0,287	0,13	0,11	0,14
19	9,85	40,8496	2,094	0,26	2,164	1,022
20	10,27	22,2659	2,26	0,16	1,18	1,102
21	10,71	8,6405	1,239	0,13	0,458	0,604
22	11,05	5,1396	0,419	0,19	0,272	0,204
23	11,66	19,9451	2,375	0,12	1,057	1,159
24	11,91	5,609	1,066	0,11	0,297	0,52
25	12,1	13,9308	1,731	0,15	0,738	0,845
26	12,65	165,9654	22,908	0,11	8,794	11,176
27	12,95	33,4381	4,179	0,12	1,772	2,039
28	14,03	76,6947	2,414	0,5	4,065	1,179
-	Total	1887,256	204,978			

Obr. 12 HPLC neznámé látky v extraktu kalusu *Centella asiatica* - prekurzor PHB 200 mg/l, interval odběru 24 hod., 17. pasáž-světlo



Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	1,72	114,936	20,622	0,11	4,49	5,454
→ 2	1,89	587,1445	200,701	0,05	22,938	53,077
3	2,51	317,467	27,228	0,13	12,403	7,201
4	3,06	3,9206	0,437	0,16	0,153	0,115
5	3,4	1,0238	0,132	0,13	0,04	0,035
6	3,88	81,1455	4,368	0,33	3,17	1,155
7	4,24	16,2921	3,021	0,1	0,636	0,799
8	4,58	152,2369	6,278	0,43	5,948	1,66
9	5,27	234,6926	20,559	0,18	9,169	5,437
10	5,83	4,3941	0,611	0,13	0,172	0,161
11	6,15	91,7459	7,534	0,2	3,584	1,992
12	6,68	12,2734	0,968	0,22	0,479	0,256
13	7,31	432,2219	42,571	0,14	16,886	11,258
14	8,09	74,2831	4,574	0,26	2,902	1,21
15	8,62	25,6417	2,661	0,13	1,002	0,704
16	9,77	46,7136	1,928	0,22	1,825	0,51
17	10,22	29,3677	3,387	0,12	1,147	0,896
18	10,89	17,3379	2,963	0,12	0,677	0,783
19	11,59	49,9856	8,493	0,12	1,953	2,246
20	11,85	52,4211	3,051	0,32	2,048	0,807
21	12,59	171,4184	15,129	0,12	6,697	4,001
22	13,39	43,0007	0,919	0,11	1,681	0,243
-	Total	2559,664	378,133			

Obr. 13 HPLC neznámé látky v extraktu kalusu *Centella asiatica* - prekurzor PHB 200 mg/l, interval odběru 6 hod., 17. pasáž-světlo

6. Diskuze

Řada biotechnologických postupů má v dnešní době své nezastupitelné místo v mnoha odvětvích průmyslu a zároveň probíhá rychlý rozvoj nových biotechnologií. Hlavní způsob využití rostlinných kultur *in vitro* ve farmacii je produkce sekundárních rostlinných metabolitů, což jsou látky často terapeuticky velmi významné viz. teoretická část mé práce. Rostlinné tkáňové kultury produkované pro farmaceutický průmysl mají vzhledem k intaktním rostlinám řadu výhod. Například přesně definované a kontrolované podmínky kultivace, možnost ovlivnění biotransformace žádaným směrem, eliminace škůdců a nezávislost na klimatických podmínkách. Biotransformaci (biokonverzi) lze definovat jako přeměnu prekurzoru (substrátu) na produkt. Než ale získáme technologicky přesný proces plně využitelný i v praxi, musí předcházet často velmi zdlouhavý výzkum, který se zabývá odvozením tkáňové kultury z rostlinného materiálu, optimalizací živného média a kultivačních podmínek, zjištěním přesného spektra produkovaných metabolitů i možnému ovlivnění biotransformačních schopností s využitím vhodných prekurzorů a elicitorů. Značným problémem je také samotné převedení tkáňové kultury do průmyslu a ekonomizace celého procesu.

Mým úkolem bylo odvození *in vitro* kultury *Centella asiatica* a ověření a sledování biotransformačních schopností této kultury po přidání exogenních prekurzorů arbutinu. Tato rostlina je využívána v řadě východních zemí. Je ceněna pro své obsahové látky, které se používají k léčení řady chorob a mají i výrazné celkové imunostimulační účinky. Jako výchozí materiál pro odvození kultur jsem použila mladé lístky a úžlabní pupeny *Centella asiatica*. Jako živné médium jsem použila půdu podle Murashigeho a Skooga (101) s přísadkou 0,5 mg/l 2,4 dichlorfenoxycetové kyseliny a 0,5 mg/l benzyladeninu (102). Zde jsme vycházeli z poznatků Farmaceutické fakulty Univerzity v Paříži, kde se zabývali glykosylačními schopnostmi tkáňové kultury *Centella asiatica*, které ověřili na konverzi 3-demethylthiokolchicinu na thiokolchicosid (3-O-glucosylthiocolchicin) (102). Schopnost biotransformační produkce arbutinu po přidání prekurzorů byla dále prokázána u kultur *Datura meleoides*, *Datura innoxia*, *Rhodiola rosea*, *Rheum palmatum*, *Leuzea carthamoides*, *Leonurus cardiaca*, *Coronilla varia*, *Brassica oleracea*, *Bergenia crassifolia*, *Bellis perennis* (103), *Rauwolfia serpentina* a *Catharantus roseus* (104, 105).

K biotransformačním pokusům byly použity výše zmiňované kalusové kultury *Centella asiatica* a jako prekurzory byly použity: hydrochinon, kyselina p-kumarová, kyselina 4-hydroxybenzoová a tyrosin, které jsou součástí biosyntetické cesty vedoucí k arbutinu. Jako možné produkty jsme sledovali arbutin, methylarbutin, p-methoxyfenol a hydrochinon. Žádná z těchto látek není pokusné rostlině vlastní.

Pokusy byly prováděny na můstcích z filtračního papíru v tekutém živném médiu, na které jsme kalusy převedli a dále udržovali. Vždy po třech týdnech kultivace jsme do média sterilně přidávali roztoky prekurzorů a to ve dvou koncentracích 100mg/l a 200 mg/l. Pokusy byly ukončeny vždy v určitém intervalu po 6, 24 a 168 hodinách.

V extraktech kalusů byl pomocí metody TLC ze sledovaných metabolitů prokázán pouze arbutin a to po přidání jeho prekurzoru hydrochinonu v intervalech 168 hodin v koncentraci 100 mg/l a 24 a 168 hodin v koncentraci 200 mg/l. Arbutin nebyl v žádné pokusné variantě uvolňován do média. V médiu byl identifikován netransformovaný hydrochinon a to při jeho přidání do média v obou použitých koncentracích.(Tab. 1, 3).

Zajímavé je nalezení neznámé látky v extraktech kalusu po přidání prekurzoru kyseliny 4-hydroxybenzoové a to po 168 hodinách v koncentraci 100 mg/l a po 6 a 24 hodinách v koncentraci 200 mg/l. Tato látka je zde v nezanedbatelné koncentraci a předmětem dalšího výzkumu bude její identifikace (Tab. 6, 8).

Kvantitativní hodnocení bylo provedeno pomocí metody HPLC, která zároveň ověřila výsledky TLC a určila přesné množství arbutinu v extraktech kalusu po přidání hydrochinonu. Množství arbutinu po 168 hodinách při koncentraci 100 mg/l hydrochinonu bylo 0,1418 % (Obr.8) a při koncentraci 200 mg/l hydrochinonu bylo zjištěno po 24 hodinách 0,3644 % (Obr.9) a po 168 hodinách 0,504 % arbutinu (Obr.10). Z těchto výsledků vyplývá, že zvýšením koncentrace hydrochinonu ze 100 mg/l na 200 mg/l došlo i ke zvýšení produkce arbutinu a ten byl prokázán už po 24 hodinách kultivace. Bylo by zajímavé zjistit, zda stejný pozitivní vliv na produkci arbutinu bude mít další zvyšování koncentrace zmiňovaného prekurzoru a případné změny časových intervalů jeho působení.

Předchozí výsledky dosažené na naší katedře při pokusech s kulturou *Datura meteloides* (103), která přidáním prekurzoru hydrochinonu po týdenní kultivaci produkovala 7,4 % arbutinu, což odpovídá přibližnému obsahu v intaktní rostlině *Arctostaphylos uva-ursi*. Další výrazně pozitivní výsledky byly nalezeny u kultury

Schizandra chinensis, která také po týdenní kultivaci při použití hydrochinonu jako prekurzoru produkovala 5,08 % arbutinu. V této pokusné variantě docházelo i k uvolňování arbutinu do živného média a to v koncentraci 0,18 % (103). V Japonsku vědci firmy Shiseido (99) s využitím buněčné kultury *Catharanthus roseus* postupným vývojem optimálních podmínek a typu fermentoru dosáhli extracelulární koncentrace arbutinu přibližně 1 %, navíc byl tento extracelulární arbutin lehce extrahovatelný z filtrátu.

V porovnání s těmito údaji jsou námi nalezené hodnoty arbutinu nižší. Naše výsledky mohly být ovlivněny delším odstavením přístroje z důvodu závady (téměř rok), kdy v extraktech mohlo dojít k rozkladu látek získaných transformací přidávaných prekurzorů.

Z výše zmiňovaného důvodu by bylo vhodné uvedené pokusné varianty zopakovat, případně se snažit o zvýšení produkce sledovaných látek například optimalizací kultivačních podmínek (růstové látky), zvýšením koncentrace prekurzorů a použitím a použitím dalších časových intervalů.

7. Závěr

Získané poznatky z diplomové práce lze shrnout následovně:

1. Ze sterilních lístků *Centella asiatica* byly odvozeny kultury schopné dlouhodobé kultivace.
2. Byla prokázána schopnost kultury *Centella asiatica* glykosylovat hydrochinon na arbutin.
3. Zvýšením koncentrace prekurzoru hydrochinonu došlo ke zvýšení produkce arbutinu
4. V extraktech kalusů kultury *Centella asiatica* byla po přidání prekurzoru kyseliny 4-hydroxybenzoové opakovaně nalezena neznámá látka ve zvýšené koncentraci
5. Ostatní přidávané prekurzory neprokázaly žádné biotransformační změny
6. Nebylo prokázáno žádné uvolňování arbutinu ani jiné látky do živného média kultury *Centella asiatica*

8. Literatura

1. NOVÁK, F.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Academia, Praha, 1990, s. 13 .
2. ŠEBÁNEK, J.: Fyziologie rostlin. SZN, Praha, 1983, s. 303.
3. VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK, elektronická edice, Maxdorf s.r.o., Praha, 2005.
4. DORNENBURG, H., KNORR, D.: Strategies for improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme Mikrobiol. Technol. 17, 675, (1995).
5. STREET, H.E. et al.: Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977. Cit. dle 4
6. KOVÁČ, J.: Tkáňové kultury a jejich využití k mikropropagaci rostlin. Přírodní vědy 42 (4), 122-124, (1990).
7. TABATA, M., FUJITA, T.: Producing of shikonin by plant cell cultures. In: Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties. Academia press, New York, 1985, s. 207-218. Cit. dle 4
8. PARK, J.M., GILDA, K.L., SONGSTAD, D.D.: Industrial production of sanguinarine from cell suspension cultures of *Papaver somniferum*. Proc. Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference'90, Kyungju, Korea, 22-25.4. 1990. Cit. dle 4
9. STRAFFORD, A.: The manufacture of food Ingredients plant cell and tissue cultures. Trends Food Sci. Technol. 4, 116-122, (1991). Cit. dle 4
10. TAKHTAJAN, A.: Diversity and classification of flowering plants. Columbia university press, Columbia, 1986, s. 588.
11. SUKHDER, S.H., DEEPAK, M., ANUPAM, K.K.(eds.): Joint Publication of regional research laboratory (Council of scientific & industrial research, Jammu Tawi

and Indian drug manufactures Association, Mumbai), Indian Herbal Pharmacopoeia. Vol. 1, Mumbai 1998, s. 47-55.

12. WHO library cataloguing in Publication Data. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 1, Malta 1999, ISBN 92 154517 8, s. 77-85.

13. PORCHER, M.H., et al.: Multilingual Multiscript Plant Name Databáze: Sorting *Centella* Names. Institute of Land & Food Resources, The University of Melbourne 1995-www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Centella.html

14. *Centella asiatica* selected triterpenes. A highly standardized natural rezedý for the maintenance of an healthy venous system. Propagační brožura firmy Indena, Milano 1998- <http://www.indena.it>

15. Northern Prairie Wildlife Research Center: Southern Wetland Flora; Erect Coinleaf [*Centella erecta* (L.f.) Fernald]-
[http://www.npwrc.urgs.gov/resource/1999/soutflor/species/8/centella .htm](http://www.npwrc.urgs.gov/resource/1999/soutflor/species/8/centella.htm)

16. SHAH, C.S., QUADRY, J.S.: Text book of Pharmacognosy, Prakashan, Ahmedabad 1985. Cit.dle 13

17. Kolektiv autorů, Český lékopis 2002, Grada, Praha, 2002, s. 1912-1915.

18. TANG, W., EISENBRAND G.: Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and use in Tradicional and Modern Medicine. Springer-Verlag, Heidelberg, 1992, s. 589-591.

19. BIWAS, T. K., MUKHERJEE, B.: Plant medicines of Indian origin for wound healing activity. www.pubmed.com-PMID: 15866825, March 2003

20. SOUMYANATH, A. et al.: *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation in-vitro. www.pubmed.com- PMID: 16105244, September 2005

21. CHEN, Y. et al.: Effects of total triterpenes of *Centella asiatica* on the corticosterone levels in serum and contents of monoamine in depression rat brain. www.pubmed.com- PMID: 16209267, Juni 2005
22. SHARMA, R., SHARMA, J.: Modification of gamma ray induced changes in the mouse hepatocytes by *Centella asiatica* extract: in vivo studies. www.pubmed.com- PMID: 16161023, July 2005
23. RAO, S.B., CHETANA, M., UMA DEVI, P.: *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. www.pubmed.com- PMID: 16214185, October 2005
24. PUNTUREE, K. et al.: Immunomodulatory activities of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus* extracts. www.pubmed.com- PMID: 16389662, July-September 2005
25. GUPTA, R., FLORA, S.J.: Effect of *Centella asiatica* on arsenic induced oxidative stress and metal distribution in rats. www.pubmed.com- PMID: 16389662, January 2006
26. HUBÍK, J., a kol.: Obecná farmakognosie II. Sekundární látky. SPN, Praha 1986, s.72-79.
27. MISAWA, M.: Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolite. Fao Agr. Serv. Bull. No 108, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 1994, <http://www.fao.org/docrep/t0831e/t0831e07.htm#6.4>
28. KAMIMURA, S.: In Komamine, A., Misawa, M., DiCosmo, F. (Eds.), Plant Cell Culture in Japan, CMC Co., Tokyo, 1991, s.27-38. Cit. dle 27
29. STABA, E.J. et al.: J. Nat. Prod. 45, 256-262, (1982). Cit. dle 27
30. CONSTABEL, F.: In Phillipson, J.D. (Ed.), Chemistry and biology of isoquinoline alkaloids, Springer-Verlag, Berlin, 1985, s.257-264. Cit. dle 27

31. FURUYA, T. et al.: *Phytochem.* 11, 3041-3044, (1972). Cit. dle 27
32. KAMO, K.K., MAHLBERG, P.G.: In Bajaj, Y.P.S., (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4*, Springer-Verlag, Berlin, 1988, s. 251-263. Cit. dle 27
33. EILERT, U. et al.: *J. Plant Physiol.* 119, 77-87, (1985). Cit. dle 27
34. FURUYA, T.: Japanese Patent, Kokai Sho-59-159790 (1984). Cit. dle 27
35. FURUYA, T., Shono, K., Ikuta, A.: *Phytochem.* 11, 175, (1972). Cit. dle 27
36. YAMAMOTO, H.: *Shoyakugaku.* 35, 15, (1981). Cit. dle 27
37. SATO, F., YAMADA, Y.: *Phytochem.* 23, 281, (1984). Cit. dle 27
38. HARA, Y. et al.: *J. Plant Physiol.* 133, 12, (1988). Cit. dle 27
39. HARA, H. et al.: *Plant Cell Res.* 10, 494-497, (1991). Cit. dle 27
40. TABATA, M., YAMADA, H., HIRAKAWA, N.: *Les Cultures de Tissue de Plantes*, CNRS, Paris, 1971, s. 389. Cit. dle 27
41. MITSUNO, M. et al.: 8th Meeting of Plant Tissue Culture, Toyama, Japan, July 1983. Cit. dle 27
42. ENDO, T., Yamada, Y.: *Phytochem.* 24, 1233-1236, (1985). Cit. dle 27
43. KITAMURA, Y.: In Bajaj, Y.P.S., (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4*, Springer-Verlag, Berlin, 1988, s. 419-436. Cit. dle 27

44. FLORES, H.E., FILNER, P.: Metabolic relationships of putrescin, GABA and alkaloids in cell and root cultures of *Solanaceae*. In Neumann, K.H., Barz, W., Reinhard, E. (Eds.), Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, Springer-Verlag, Berlin, 1985, s.174-185.
45. HILDEBRANDT, A.L., RIKER, A.J.: La culture des tissus vegetaux 42 (1953).
Cit. dle 27
46. STABA, E.J.: J. Pharm. Sci. 51, 249-254, (1962). Cit. dle 27
47. LUI, J.H.C., STABA, E.J.: Phytochem. 18, 1913-1916, (1979). Cit. dle 27
48. KARTNING, Th. et al.: Planta Med. 47, 247-248, (1983). Cit. dle 27
49. GRAVES, J.M.H., SMITH, W.K.: Nature 214, London, 1967, s. 1248-1249.
Cit. dle 27
50. REINHARDT, E.: In Street, H.E.,(Ed.), Tissue Culture and Plant Science, Academic Press, 1974, s. 433. Cit. dle 27
51. BRAIN, K.R.: Plant Sci. Lett. 7, 157-161, (1976). Cit. dle 27
52. TERAMOTO, S., KOMAMINE, A.: In Bajaj. Y.P.S., (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 4, Springer-Verlag, Berlin, 1988, s. 209-224. Cit. dle 27
53. BECKER, H., CHAVADEJ, S.: ibid. 294-309 (1988). Cit. dle 27
54. BECKER, H. et al.: Proc., 3rd Eur. Cong. Biotech. Vol. 1, Munchen, 1984, s. 203-207. Cit. dle 27
55. BECKER, H., CHAVADEJ, S.: J. Nat. Prod. 48, 17-21, (1985). Cit. dle 27
56. SUFFNESS, M., DOUROS, J.: ibid. 45, 1-14, (1982). Cit. dle 27

57. WALL, M.E. et al.: J. Am. Chem. Soc. 88, 3888-3890, (1966). Cit. dle 27
58. SAKATO, K., MISAWA, M.: Agric. Biol. Chem. 38, 491-497, (1974).
Cit. dle 27
59. Van HENGEL, A.J. et al.: Plant Tissue Cell Organ Cult. 28, 11-18, (1992). Cit.
dle 27
60. POWELL, R.G. et al.: Tetrahedron Lett. 46, 4081-4084, (1969). Cit. dle 27
61. DELFEL, N.E., SMITH, L.J.: Planta Med. 40, 239-244, (1980). Cit. dle 27
62. MISAWA, M., ENDO, T.: In Constabel, F., (Ed), Genetics of Plants, Vol. 5,
Academic Press, New York, 1988, s. 553-568. Cit. dle 27
63. TAKAYAMA, S.: In preparation. Cit. dle 27
64. MISAWA, M., HAYASHI, M., TAKAYAMA, S.: Planta Med. 49, 115-119,
(1983). Cit. dle 27
65. NISSEN, N.I. et al.: Cancer Chemother. Rep. 56, 769-777, (1972). Cit. dle 27
66. KADKADE, P.G.: Plant Sci. Lett. 25, 107-115, (1982). Cit. dle 27
67. SAKATA, K., MORITA, E., TAKEZONO, T.: Ann. Meeting of the Soc. of
Agric. Chem., Fukuoka, Japan, 30.3.1990. Cit. dle 27
68. WOERDENBERG, H.J., et al.: Plant Cell Rep. 9, 9-100, (1990). Cit. dle 27
69. HEYENGA, A.G.: Plant Cell. Rep. 9, 382-385, (1992). Cit. dle 27
70. SMOOTLY, T. et al.: 40th Ann. Cong. on Medicinal Plant Research, Trieste,
Italy, 1.-5.9, 1992. Cit. dle 27

71. MISAWA, M. et al.: *Phytochem.* 27, 2147, (1988). Cit. dle 27
72. MISAWA, M.: Abstracts in BIO '87 Japan, Osaka, Japan, 12.-15.10.1987, s. 159.
Cit. dle 27
73. GOODBODY, A.E. et al.: *Planta Med.* 54, 136-140, (1988). Cit. dle 27
74. SMITH, J.I., SMART, N.J. et al.: In Somers, D.A. et al., (Eds.), VI Int'l Cong. of
Plant Tissue and Cell Culture., Univ. Minnesota Press., Minneapolis, 1986, s. 248.
Cit. dle 27
75. HARA, Y. et al.: Ann. Meeting of the Soc. of Agr. Chem. in Japan., Fukuoka,
Japan, 30.3.1990. Cit. dle 27
76. BEDE, J., DiCOSMO, F.: 40th Ann. Cong. on Medicinal Plant Research, Trieste,
Italy, 1-5.9. 1992. Cit. dle 27
77. WANI, M.C., TAYLOR, H., WALL, M.E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325,
(1971). Cit. dle 27
78. SCHIFF, P.B., FANT, J. HORWITA, S.B.: *Nature* 277, 665, (1979). Cit. dle 27
79. GUERITTE-VOEGELEIN, F. et al.: *Tetrahedron* 42, 4451, (1986). Cit. dle 27
80. CHRISTEN, A.A. et al.: U.S. Patent 5019504 (1991). Cit. dle 27
81. SHULER, M.L. et al.: 2nd NCI Workshop in Taxol and Taxus, Alexandria, VA,
U.S.A., 23-24.9.1992. Cit. dle 27
82. WICKREMESINHE, et al.: *ibid*, (1992). Cit. dle 27

83. HAN, K.-H., GORDEN, M.F.: Int'l Yew Resources Conference, Berkeley CA, U.S.A., 12.-13.3.1993. Cit. dle 27
84. FETT-NETO, A.G., et al.: *Biotechnology* 10, 1572-1575, (1992). Cit. dle 27
85. CHOI, K.T.: In Bajaj, Y.S.P., (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 4, Springer-Verlag, Berlin, 1988, s. 484-500. Cit. dle 27
86. FURUYA, T. et al.: *Ferment. Technol. Today*, 697-703, (1972). Cit. dle 27
87. FURUYA, T. et al.: *Planta Med.* 48, 83-87, (1983). Cit. dle 27
88. FURUYA, T., ISHII, T.: Japan Patent (Kokai) 73-31917 (1973). Cit. dle 27
89. JHANG, J.J., STABA, E.J.: *In Vitro* 9, 253-259, (1974). Cit. dle 27
90. USHIYAMA, K.: In Komamine, A., Misawa, M., DiCosmo, F., (Eds.), *Plant Cell Culture in Japan*, CMC Co. Tokyo, Japan, 1991, s. 92-98. Cit. dle 27
91. ELLIS, B.E.: *Can. J. Biol.* 62, 2912-2917, (1984). Cit. dle 27
92. De-EKNAMKULI, W., ELLIS, B.E.: In Bajaj, Y.S.P., (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 4, Springer-Verlag, Berlin, 1988, s. 310-329. Cit. dle 27
93. FUKUI, H. et al.: *Phytochem.* 23, 2389-2399, (1984). Cit. dle 27
94. ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ULBRICH, B.: *Naturwis.* 64, 585-586 (1977). Cit. dle 27
95. PETERSON, M., ALFERMANN, A.W.: *Z. Naturforsch.* 43C, 501-504, (1988). Cit. dle 27
96. MIZUKAMI, H., ELLIS, B.E.: *Plant Cell Res.* 10, 321, (1991). Cit. dle 27

97. ULBRICH, B., WIESNER, W., ARENS, H.: Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In Neumann, K.H., Barz W., Reinhard, E. (Eds.), Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, Springer-Verlag, Berlin, 1985, s.293-303.
98. AKIU, S. et al.: Proc. Japan Soc. Invest. Dermatol. 12, 138, (1988). Cit. dle 27
99. YOKOYAMA M., YANAGI, M.: In Komamine, A., Misawa, M, DiCosmo, F., (Eds.), Plant Cell Culture in Japan, CMC Co., Tokyo, Japan, 1991, s. 79-91. Cit. dle 27
100. TABATA, M. et al.: Phytochem. 15, 12-25, (1976). Cit. dle 27
101. MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473, (1962).
102. BOUHOUCHE, N. et al.: Conversion of 3-demethylthiocolchicine into thiocolchicoside by *Centella asiatica* suspension cultures. Phytochem. 45, 743-747, (1998).
103. DUŠKOVÁ, J. et al.: Zur Biotransformation von Hydrochinon zu Arbutin in den *in vitro*-Kulturen. Herba Pol. 45, 23, (1999).
104. STOCKIGT, J. et al.: Plant Cell Tissue Organ Cult. 43, 97, (1995). Cit. dle 103
105. YOKOYAMA, M. et al.: Plant Cell Physiol. 31, 551, (1990). Cit. dle 103