

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



KATEDRA FARMAKOGNOZIE

**OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH
METABOLITŮ V *IN VITRO* KULTURÁCH
SCUTELLARIA BAICALENSIS GEORGII**

Disertační práce

Mgr. JAN MARTIN

Školitel: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Hradec Králové 2006

Děkuji Doc. RNDr. Jaroslavu Duškovi, CSc. za odborné vedení, pomoc a dobré rady během mého postgraduálního studia. Děkuji také všem ostatním kolegům z katedry farmakognozie za spolupráci a příjemné pracovní prostředí.

Dále děkuji výzkumným záměrům MSM111600003 a MSM0021620822 za finanční podporu.

Jan Martin

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. ŘEŠENÁ PROBLEMATIKA	12
3. TEORETICKÁ ČÁST	13
3. 1. Popis rostliny.....	13
3. 2. Droga a její tradiční užití	14
3. 3. Obsahové látky.....	15
3. 4. Biologické účinky	16
3. 4. 1. Vychytávání volných radikálů a antioxidační účinek.....	16
3. 4. 2. Antihypertenzivní a protizánětlivý účinek	19
3. 4. 3. Antibakteriální a antivirozní účinek	22
3. 4. 4. Cytostatický a imunomodulační účinek	23
3. 4. 5. Sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní působení.....	24
3. 4. 6. Vliv na fibrinolytický systém	25
3. 4. 7. Vasokonstrikční a vasodilatační účinky	26
3. 4. 8. Antialergické účinky.....	26
3. 4. 9. Vliv na další enzymové systémy	26
3. 4. 10. Toxicita.....	27
3. 4. 11. Shrnutí biologických účinků.....	28
3. 5. Explantátové kultury rostlin.....	32
3. 5. 1. Odvození a druhy explantátových kultur.....	33
3. 5. 2. Kultivace explantátových kultur.....	34
3. 6. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů.....	36
3. 6. 1. Výběh rostlinného materiálu a selekce.....	36
3. 6. 2. Kultivační podmínky	37
3. 6. 3. Prekurzory	38
3. 6. 4. Biotransformace.....	38
3. 6. 5. Elicitace	39

3. 6. 6.	Imobilizace.....	41
3. 6. 7.	Genetické manipulace.....	42
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4. 1.	Použité chemikálie a přístroje	43
4. 1. 1	Chemikálie	43
4. 1. 2.	Přístroje a chromatografické doplňky.....	44
4. 1.	Založení a kultivace <i>in vitro</i> kultur <i>S. baicalensis</i>	45
4. 1. 1.	Založení kalusové kultury.....	44
4. 1. 2.	Pasážování	45
4. 1. 3.	Živné médium.....	45
4. 1. 4.	Odvození a kultivace suspenzních a kořenových kultur.....	47
4. 2.	HPLC analýza baicalinu a baicaleinu.....	48
4. 2. 1.	Příprava vzorků.....	48
4. 2. 2.	HPLC analýza	48
4. 2. 3.	Validace HPLC analýzy.....	51
4. 3.	Optimalizace kultivačních podmínek.....	52
4. 3. 1.	Sledování vlivu fytohormonů na kultury <i>S. baicalensis</i>	52
4. 2. 2.	Sledování vlivu délky osvětlení na kultury <i>S. baicalensis</i>	53
4. 4.	Vliv potenciálních prekurzorů.....	54
4. 4.	Vliv elicitace reaktivními formami kyslíku	55
4. 4. 1.	Sledování vlivu methylenové modři	55
4. 4. 2.	Sledování vlivu peroxidu vodíku	55
4. 5.	Vliv elicitace těžkými kovy	56
4. 5. 1.	Sledování vlivu měďnatých iontů.....	56
4. 6.	Kultivace suspenzní kultury v laboratorním bioreaktoru	56
4. 6. 1.	Příprava bioreaktoru	56
4. 6. 2.	Inokulace, kultivace a odběr vzorků	57
4. 6. 3.	Stanovení sušiny	57
4. 6. 4.	Optimalizace kultivačních podmínek	58

4. 7.	Statistické zpracování výsledků	58
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	60
5. 1.	Založení a kultivace explantátových kultur <i>S. baicalensis</i>	60
5. 2.	Sledování vlivu fytohormonů kultury <i>S. baicalensis</i>	63
5. 3.	Sledování vlivu délky osvětlení na kultury <i>S. baicalensis</i>	65
5. 4.	Sledování vlivu potenciálních prekurzorů	70
5. 5.	Vliv elicitace reaktivními formami kyslíku	77
5. 6.	Sledování vlivu měďnatých iontů	81
5. 7.	Kultivace suspenzní kultury v laboratorním bioreaktoru.....	86
6.	ZÁVĚR.....	87
7.	POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY	90
8.	OBRAZOVÁ PŘÍLOHA.....	92
9.	LITERATURA	95

1. ÚVOD

Vyšší rostliny jsou důležitým zdrojem molekulárních struktur používaných jako léčiva, potravní doplňky, pesticidy, korigencia chuti a vůně. Tyto látky jsou obvykle získávány z rostlin rostoucích divoce nebo v kulturních podmínkách. Některé rostlinné produkty mohou být produkovány i chemickou syntézou, což může být jednak finančně výhodné, jednak to zajišťuje přísun produktu bez ohledu na roční dobu.

Rostlinné kultury *in vitro* představují alternativní přístup, který může být za jistých podmínek výhodný. Například u rostlin náročných na pěstování, u rostlin rostoucích pomalu, u rostlin s velmi nízkými obsahy požadovaných látek, a také u látek, jejichž produkce je vázána na specifický, těžko získatelný rostlinný orgán (např.: šafrán). Zároveň musí být produkt obtížně syntetizovatelný chemickou cestou. V těchto případech produkce pomocí kultur *in vitro* poskytuje výhody plně kontrolovatelných a reprodukovatelných podmínek a nezávislost na geografických a klimatických faktorech. Oproti klasickým postupům má mnoho dalších výhod: minimální výkyvy v kvalitě výstupní suroviny, neexistence ztrát vzniklých při skladování drog, možnost okamžité návaznosti procesů bez nutnosti přepravy surovin, produkce dané látky se může rychle přizpůsobit poptávce, vyloučení geografických vlivů atd.

Na druhou stranu je zavádění těchto technologií ekonomicky i časově náročné a vyžaduje specialisované a vyškolené pracovníky. Přes řadu problémů se v některých případech podařilo využívat kultury *in vitro* i průmyslově. Například japonská firma Mitsui Petrochemical Industry Co. Ltd. zavedla výrobu šikoninu z kultur *Lithospermum erythrorhizon*. Dalším příkladem může být produkce žen-šenové (*Panax*

ginseng) biomasy firmou Nitto Denko Co. Ltd. V současnosti je již samozřejmostí využívání kultur *in vitro* při šlechtění a množení rostlin.

2. ŘEŠENÁ PROBLEMATIKA

Tato disertační práce, která má název „Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách *Scutellaria baicalensis* Georgii“, se zabývá problematikou kultivace explantátových kultur výše zmíněné rostliny a také možnostmi zvýšení produkce sekundárních metabolitů v těchto kulturách.

Cílem této práce bylo:

- z informačních zdrojů vypracovat přehled o rostlině *Scutellaria baicalensis* Georgii se zaměřením na biologickou aktivitu obsahových látek
- odvodit kalusovou kulturu z rostliny *Scutellaria baicalensis* Georgii a založit další typy explantátových kultur.
- vypracovat vlastní HPLC analytickou metodu pro kvantitativní stanovení sledovaných flavonoidů (baicalin, baicalein)
- optimalizovat kultivační podmínky z hlediska produkce flavonoidů se zaměřením na vliv světelné periody a obsah rostlinných hormonů v živném médiu
- sledovat vliv vybraných potenciálních prekurzorů na obsah flavonoidů
- sledovat vliv vybraných elicitorů na obsah flavonoidů
- převést suspenzní kulturu do laboratorního bioreaktoru a optimalizovat kultivační podmínky

3. TEORETICKÁ ČÁST

Léčivé rostliny jako léčiva přírodního původu jsou užívány odedávna a jejich účinky tak byly ověřeny staletými empirickými zkušenostmi. Současná věda si klade mimo jiné za cíl poznat příčiny i mechanismus terapeutického účinku těchto tradičních rostlin. Jsou tak objevovány nové obsahové látky i další dosud neznámé účinky rostlinných drog. Platí to nejen o našich místních léčivých rostlinách, ale i o rostlinách tradiční čínské medicíny. A právě jednou z těchto rostlin je *Scutellaria baicalensis* Georgii (šišák bajkalský).

Hlavními obsahovými látkami jsou flavonoidy. Jsou to látky glykosidického charakteru, mající široké spektrum biologických účinků. Proto jsou rostliny s jejich obsahem v poslední době podrobovány intenzivnímu výzkumu po celém světě.

3. 1. Popis rostliny

Scutellaria baicalensis Georgii - šišák bajkalský - je vytrvalá rostlina z čeledi *Lamiaceae* dosahující výšky 30 až 60 cm, s bohatě větvenou, čtyřhrannou lodyhou, která bývá na bázi purpurově začervenalá, na vrcholu zelená, vystoupavá až poléhavá. Tuhé, kožovité listy jsou křížmostojné, jednoduché, celokrajné a kopinaté. Kořen má obvykle 2 cm tlustý, větvenovitý, na povrchu hnědý, na řezu žlutý.

Šišák kvete koncem léta a na podzim. Má nápadně modré květy, které jsou uspořádány do 7 - 15 cm dlouhých jednostranných hroznů. Kalich květu je dvoupyský s dutým štítkovitým výrůstkem (*scutellum*), který je dobře patrný i po odkvětu na plodu. Koruna je též

dvoupyská. Na bázi je prohnutá vzhůru, spodní pysk je mělce dvoulaločný, horní přilbovitý a chlupatý. Plodem je černohnědá, vejcovitá drobná tvrdka.

Šišák bajkalský roste v lesostepních oblastech východního Zabajkalí, na středním toku Amuru (Rusko), v severní Koreji, Číně, Japonsku a severovýchodním Mongolsku. Můžeme ho najít na otevřených, suchých stanovištích s přímým sluncem či polostínem. U nás má poměrně vhodné klimatické podmínky a dá se dobře pěstovat.²⁾

3. 2. Droga a její tradiční užití

Šišák bajkalský je v Číně a Japonsku již asi dva tisíce let používán jako léčivá bylina. V Číně je znám pod názvem „Huang qin“ a v Japonsku jako „Wogon“.¹⁾ První zmínka o jeho užívání pochází z Shennongova kánonu léčivých rostlin, který je datován do období dynastie Han (206 př. n l. - 220 po Kr.).²⁾

Droga se získává z kořenů tříletých, nebo čtyřletých rostlin sbíraných na jaře nebo na podzim. Po očištění, odstranění zevní hrubé vrstvy a rozkrájení na menší kousky se suší v suchých místnostech přírodním nebo umělým teplem.

Tradiční čínská medicína využívala šišáku při hypertenzi, proti krvácení z nosu, vnitřnímu krvácení, při zánětech v krku, zánětech ledvin, kašli, zvracení, silné menstruaci, také při záškrtu, spále a hepatitidě.³⁾

Dnes je kořenů této rostliny užíváno jako antipyretika, antihypertenziva, sedativa, na léčení zánětů, alergií, nespavosti.^{4,5)} Šišák bajkalský též slouží při odstraňování subjektivních symptomů, jako jsou bolesti hlavy a bolesti v oblasti srdce.

Vedlejší účinky drogy nebyly zatím popsány. Traduje se poškození jater po požití bylinných směsí obsahujících šišák, ale hepatotoxický efekt byl po bližším výzkumu vyvrácen. Poškození jater způsobila jiná složka (germander).^{6, 7)}

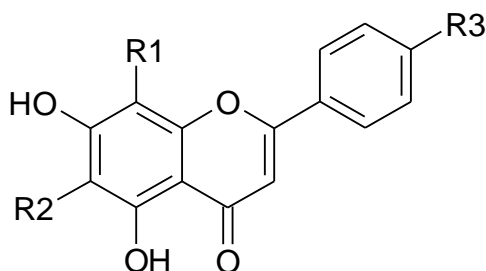
3. 3. Obsahové látky

Flavonoidy jsou hlavními obsahovými látkami této rostliny. Jsou přítomny hlavně ve formě glykosidů jako glukuronidy, méně často jako glukopyranosidy. Liší se od sebe různým počtem a postavením hydroxylových a methoxylových skupin. Celkem jich bylo v této rostlině identifikováno přes čtyřicet.

I když obsah jednotlivých flavonoidů kolísá s ročním obdobím i lokalitou sběru, obsahují rostliny nejvíce flavonoidu baicalinu.⁸⁾ V kořeni je ho 12 - 17 %. Některé zdroje však uvádí podstatně nižší obsah - 4,3 %.⁹⁾ Jeho aglykonem je baicalein.

Významnými flavonoidními glykosidy jsou i wogonosid a scutellarin a jejich aglykony wogonin a scutellarein (obr. 1). Mezi další flavonoidy a isoflavonoidy pak patří oroxylin A, oroxylin A -7-O-glucuronid, scullcapflavon I a scullcapflavon II, neobaicalein, dihydrobaicalin, dihydrooroxilin, dihydrooroxilin A, norwogonin, isowogonin, huangqin, carthamidin, isocarthamidin, 5,7,2'-trihydroxyflavon, 5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavon, chrysin-8-C- β -D-glukosid a další.^{9, 10, 11)}

Obr. 1: Základní struktura flavonoidních aglykonů obsažených v rostlině *Scutellaria baicalensis*



	R1	R2	R3
Baicalein	-H	-OH	-H
Wogonin	-OCH ₃	-H	-H
Scutellarein	-H	-OH	-OH
Oroxylin A	-H	-OCH ₃	-H

Z ostatních látek byl vedle lignanového glykosidu (+)-5,5'-dimethoxylariciresinolu prokázán obsah tří sesquilignanových glykosidů: hedytol C -4''-O-β-D-glukopyranosid, hedytol D -4''-O-β-D-glykopyranosid a erythro-guaiacylglycerol-β-syringaresinol.¹²⁾ Dalšími obsahovými látkami jsou silice, steroly a aminokyseliny.

3. 4. Biologické účinky

3. 4. 1. Vychytávání volných radikálů a antioxidační účinek

Volné radikály jsou látky schopné přímo poškozovat bílkoviny, nukleové kyseliny a lipidy. Iniciují peroxidaci lipidů, což vede k narušení buněčných membrán a organel. Vzniklé peroxidy pak působí stejně jako původní volné radikály.

U baicalinu, baicaleinu, wogonosidu a wogoninu byla zkoušena jejich aktivita proti hydroxylovému, alkylovému a DPPH radikálu (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylový radikál) *in vitro*. Baicalein a baicalin vychytávaly všechny radikály, přičemž jejich aktivita byla větší než u vitamínu E a srovnatelná s kvercetinem. Tyto látky byly použity jako standardy antioxidační aktivity.¹³⁾ Wogonin a wogonosid nevykázaly téměř žádný efekt.^{14,15)}

Na kulturách lidských embryonálních kardiomyocytů byl zkoumán vliv extraktu ze *Scutellaria baicalensis* na množství intracelulárních oxidantů (H₂O₂, hydroxylový radikál, superoxidový radikál) vzniklých po vystavení buněk desetiminutové hypoxii. Byl prokázán markantní úbytek těchto oxidantů a zároveň se podstatně snížila úmrtnost buněk.¹⁶⁾ Tento ochranný efekt je způsoben nejen vychytáváním volných radikálů a antioxidační aktivitou, ale zřejmě i interakcí baicalinu s mitochondriální NADH dehydrogenasou.¹⁷⁾ U baicaleinu bylo již dříve prokázáno, že vychytává i superoxidové a hydroxylové radikály,¹⁴⁾ ale důkaz na kulturách lidských buněk je klíčový.

Podobně byl u flavonoidů ze *Scutellaria baicalensis* testován jejich ochranný efekt proti peroxidu vodíku na kulturách lidských neuroblastomů SH-SY5Y. Baicalein a baicalin výrazně snižovaly poškození buněk peroxidem, u wogoninu byl efekt zanedbatelný a u wogonosidu žádný.^{18,19)} Studie mimo jiné ukázaly, že pro antioxidační působení je vhodné ortho- uspořádání hydroxylových skupin na základním skeletu flavonoidů.¹⁸⁾

Obdobný pokus prokázal ochranný efekt této drogy na krysí neurony vystavené desetiminutové hypoxii. Neuroprotektivní účinek souvisel s inhibicí TNF- α (tumor necrosis factor alpha) a snížením produkce oxidu dusnatého po podání metanolického extraktu *S. baicalensis*.⁹⁸⁾

V pokusech *in vitro* a na krysách se ukázalo, že extrakt z drogy, stejně jako čistý flavonoid baicalin, má velkou schopnost inhibovat peroxidaci lipidů. Baicalin se ukázal být asi 375-krát účinnější než vitamin E.²⁰⁾ Pozdější studie tyto výsledky potvrdila v pokusu na jaterních mikrosomech krys, u nichž byla iniciována peroxidace lipidů pomocí ADP-Fe²⁺-TBARS (reaktivní látky na bázi thiobarbiturátů).²¹⁾ Aglykon baicalinu - baicalein a další flavonoidy ze *Scutellaria baicalensis* (např. ganhuangenin) mají tuto schopnost také.^{22,23)}

Účinek extraktu z drogy i izolovaných flavonoidů proti fotoindukované peroxidaci lipidů byl zkoušen na liposomech a fosfatidylcholinové liposomální membráně. Podařilo se potvrdit ochranný efekt výše zmíněných látek i proti oxidaci způsobené UV zářením.²⁴⁾ Wogonin vycytává volné radikály podstatně méně než baicalein, ale významně se podílí na inhibici peroxidace lipidů a na blokování vzniku některých látek, které vznik volných radikálů iniciují (např. produkty s Fe²⁺ po rozkladu cytochromu P-450 cytochrom P-450-reduktasou).²⁵⁾

Zkoumán byl i vliv čistého baicaleinu a hexanového, acetonového a methanolového extraktu rostliny na oxidaci zahřátého řepkového oleje. Acetonový extrakt, který byl z nich neúčinnější, předčil svoji antioxidační aktivitou i standard - butylovaný hydroxytoluen.²⁶⁾

V poslední době je *Scutellaria baicalensis* díky své schopnosti vycytávat volné radikály a zabraňovat oxidaci používána v nových kosmetických přípravcích.^{27, 28)}

3. 4. 2. Antihypertenzivní a protizánětlivý účinek

Antihypertenzivní a protizánětlivý účinek látek ze *Scutellaria baicalensis* spolu vzájemně souvisí. Oba účinky jsou způsobeny stejným základním mechanismem - inhibicí enzymu lipoxxygenasy.

Lipoxxygenasa je enzym zapojený do metabolismu kyseliny arachidonové. Kyselina arachidonová je v počátečním stádiu zánětu uvolňována jako odpověď na mediátory z aktivovaných krevních destiček. Lipoxxygenasa přeměňuje volnou kyselinu arachidonovou na hydroperoxyeikosatetraennové kyseliny, z nichž vznikají leukotrieny. To jsou látky hrající významnou roli v zánětlivých procesech. Zvyšují permeabilitu cév, chemotakticky přitahují a aktivují neutrofilní granulocyty a společně s prostaglandiny vyvolávají spektrum symptomů charakterizujících zánět.

Bylo prokázáno, že baicalein selektivně inhibuje 5- a 12-lipoxxygenasu.^{29,30)} Tímto způsobem blokuje oxidaci kyseliny arachidonové na 12-HPETE, 12-HETE (hydroperoxyeikosatetraennové kyseliny). Tím zabraňuje syntéze leukotrienů a nepřímo podporuje produkci prostaglandinu PG I₂.^{31,32,33)}

U krys s hypertenzí způsobenou infuzí angiotensinu II se po podání baicaleinu (60 mg/kg) zvýšila přeměna endogenního PG H₂ na PG I₂ a došlo k poklesu krevního tlaku. Na krysy s normálním krevním tlakem baicalein nepůsobil.³⁴⁾

V současné době je zejména zkoumán jeho další vliv na oběhový systém. Zdá se, že přes inhibici lipoxxygenasy je schopen blokovat zvýšenou inkorporaci leucinu v srdečních fibroblastech. Tato inkorporace obvykle předchází patologické hypertrofii srdeční svaloviny při hypertenzi.³⁵⁾

Stejným principem, tedy inhibicí lipoxygenasy, může snižovat množství aktivovaného endothelinu-1, který je významným vazokonstriktorem a navíc působí přes další mediátory na diurézu a natriurézu.³⁶⁾

Protizánětlivý účinek baicaleinu, wogoninu a ostatních flavonoidů ze *Scutellaria baicalensis* vyplývá také z inhibice lipoxygenasy. 5-HPETE a leukotrien B4 (LTB4) jsou látky, které aktivací neutrofilů vyvolávají zánětlivou reakci. Je-li jejich syntéza blokována například baicaleinem na úrovni lipoxygenasy, zánětlivá reakce je potlačena.^{37, 38, 39, 101)}

Vliv flavonoidů z šišáku byl zkoumán na myších u nichž byl karagenovou injekcí vyvolán edém. Zatímco u baicalinu, baicaleinu i extraktu z celé rostliny došlo po perorálním podání k potlačení zánětu, wogonin tento účinek neměl.^{40, 41)} Schopnost baicaleinu léčit zánět byla později potvrzena podobným experimentem na krysách.⁴²⁾ Na granulomatózní zánět způsobený myším podkožní implantací bavlněných kuliček však flavonoidy vliv neměly.⁴⁰⁾ Tento druh zánětu totiž probíhá odlišným mechanismem a syntéza LTB4 a 5-HPETE je zde druhořadá.

Při experimentech na krysách a na buněčných kulturách *in vitro* se potvrdilo, že baicalein a další flavonoidy ze *Scutellaria baicalensis* omezují produkci nejen LTB4, ale i leukotrienu C4 (LTC4), a tím mohou ovlivňovat celou řadu chronických zánětlivých onemocnění. Zvýšená produkce LTB4 a LTC4 alveolárními makrofágy byla totiž zjištěna u chorob jako bronchiální astma, chronická bronchitida, chronická artritida, rakovina plic, záněty a nádory pojivových tkání, idiopatická pulmonární fibróza atd.³⁷⁾

Při hyperglykémii je průvodním jevem zvýšený přestup monocytů do cévních stěn a jejich vázání na endoteliální buňky. Protože jde o děj indukovaný produkcí leukotrienů, baicalein zpomaluje i tento proces.⁴³⁾

Baicalein je jako standardní inhibitor lipoxxygenasy v současné době využíván v řadě dalších biochemických experimentů, zejména ve výzkumu kardiovaskulárního systému.^{44, 45, 46, 47)}

Protizánětlivý účinek obsahových látek není založen pouze na inhibici lipoxxygenasy, ale je podpořen mechanismem vychytávání volných radikálů a v případě zánětů způsobených bakteriemi a viry se podílí přímo na odstraňování etiologického agens (viz níže).

U zánětlivého procesu způsobeného stafylokokními exotoxiny baicalin zmírňuje jeho projevy inhibicí celé řady mediátorů, jako například interleukinu 1- β , interleukinu 6, TNF (tumor necrosis factor), interferonu γ , MCP (monocyte chemotactic proteins), MIP-1- α (macrophage inflammatory protein), MIP-1- β , a snižuje exotoxiny indukovanou proliferaci T-buněk. Mechanismus, kterým se podílí na inhibici těchto látek, zatím není přesně znám.⁴⁸⁾

U flavonoidu wogoninu bylo zjištěno, že na jeho protizánětlivém účinku se zřejmě podílí i jeho schopnost inhibovat expresi MCP-1, což je protein syntetizovaný v místě zánětu. Tento protein působí jako atraktant pro monocyty a zprostředkovává tak zánětlivou reakci organismu.⁴⁹⁾

Některé studie prokazují, že wogonin ze *Scutellaria baicalensis* ovlivňuje i produkci oxidu dusnatého v organismu. Není to však přímou inhibicí enzymu iNOS (inducibile nitric oxide synthase) jak se původně předpokládalo, ale potlačením genové exprese tohoto enzymu. U baicaleinu naopak převažuje přímá inhibice iNOS. Protože indukce iNOS v makrofázích hraje významnou roli v zánětlivých procesech, dá se velká protizánětlivá aktivita flavonoidů vysvětlit i tímto mechanismem. Na cyklooxygenasu-2 (COX-2), která se podílí na tvorbě prostaglandinů a prostacyklinů, působí wogonin i baicalein oběma mechanismy (je přímým inhibitorem i zabraňuje expresi).^{50,51,52,53, 103)}

3. 4. 3. Antibakteriální a antivirozní účinek

Z tradičního užívání drogy proti zánětům krčních mandlí a dutiny ústní vyplynul zájem studovat účinky extraktu i jednotlivých obsahových látek na bakterie a viry, které tato onemocnění obvykle vyvolávají. V pokusech *in vitro* i *in vivo* byla zjištěna aktivita proti celé řadě virů, retrovirů, bakterií a hub.

Nejúčinnější látkou se ukázal být baicalin, který je aktivní zejména proti chřipkovým virům a *Staphylococcus aureus*.^{54, 55, 56} Wogonin je v pokusech *in vitro* vysoce účinný proti viru hepatitidy B⁵⁷ a proti RSV (respiratory syncytial virus).⁹⁹ Z ostatních flavonoidů se testoval *in vitro* i isoscutellarein-8-methylester a ukázal se být účinný proti chřipkovým virům A a B.⁵⁸ Extrakt z drogy je velmi účinný proti *Candida albicans*,^{59,60} *Cryptococcus neoformans*, *Pitosporum ovale*⁶⁰ a také proti trypanosomám⁶¹ a bakteriím způsobujícím zubní kazý.⁶²

V poslední době se rozběhl výzkum studující aktivitu přírodních látek na virus HIV, tedy i látek pocházejících z tradičních asijských bylin.⁶³ Baicalin se ukázal být vysoce účinný při léčbě a prevenci HIV infekce.^{64,65} Zabraňuje vstupu viru do buňky svým navázáním na chemokinové koreceptory na buněčném povrchu, ovlivňuje expresi HIV-1 specifického antigenu p24 a inhibuje aktivitu retrovirální reverzní transkriptasy v napadených buňkách^{66,67} a je tak účinný zejména v raném stadiu infekce virem HIV-1, HTLV-1 (human T-cells leukemia virus).^{68,66,67} Baicalein resp. baicalin se tak zdá být jednou z perspektivních látek pro prevenci a léčbu HIV infekcí a některých typů leukémií.

Mechanismus navazování na chemokinové receptory by mohl hrát roli i při léčbě alergických a zánětlivých reakcí organismu, při kterých jsou chemokiny jedním z mediátorů.⁶⁹

3. 4. 4. Cytostatický a imunomodulační účinek

Schopnost drogy a jejích obsahových látek působit preventivně proti vzniku nádorů a potlačovat již vzniklé rakovinné projevy je vlastně kombinací dvou výše zmíněných mechanismů působení, tzn. antioxidačního efektu - vychytávání volných radikálů a antivirózního působení na viry podílející se na etiologii některých rakovinných nemocí (např. Epstein-Baar virus).⁵⁴⁾ Tyto mechanismy působí spíše preventivně proti vzniku rakovinných nemocí.

Baicalin působí též proti některým genotoxinům a snižuje riziko genových aberací po jejich vniknutí do buňky. Tímto způsobem snižuje mutagenicitu například aflatoxinu B-1 a N-methyl-N'nitro-N-nitrosoguanidinu po podání do *Salmonella typhimurium*.⁷⁰⁾

U wogoninu byla na jaterních mikrozomech krys zjištěna schopnost zasahovat do metabolismu aflatoxinu B-1, a to na úrovni jeho přeměny na aflatoxin M-1 cytochromem P450.⁷¹⁾

Baicalin též indukuje chinonreduktasu u buněk Hepa lcl7 hepatomu a může tak způsobit rychlejší zmetabolizování některých mutageních a cytotoxických látek, jde tedy o působení chemoprotektivní.⁷²⁾

K těmto mechanismům se připojuje další, zatím neznámý, který způsobuje, že baicalin zabraňuje i proliferaci již vzniklých nádorů. Účinný je zejména proti nádorům prostaty⁷³⁾, kůže⁷⁴⁾ a rakovině prsu⁷⁵⁾, méně už proti nádorům tlustého střeva, kde jeho schopnost brzdit růst nádoru je značně závislá na typu buňky, ze které nádor vznikl.⁷⁶⁾

Extrakt ze *Scutellaria baicalensis* pomáhá normalizovat počet T-lymfocytů u pacientů s rakovinou plic, kteří prošly chemoterapií. Zároveň zvyšuje počet imunoglobulinu A, stimuluje krvetvorbu, zejména produkci erytrocytů a granulocytů v kostní dřeni a zvyšuje množství

prekurzorů (erytroidy, granulomonocytární prekurzory).^{77,78)} Látky ze *Scutellaria baicalensis* tedy pomáhají obnovit imunitní systém po velké zátěži a mohou pomáhat pacientům po absolvované chemoterapii.

V současné době probíhá celá řada výzkumů na tkáňových kulturách, které mají za cíl ověřit a zmapovat schopnost baicaleinu zasahovat proti rakovinným buňkám stejně jako jeho další prospěšné vlastnosti při terapii nádorových onemocnění. Baicalein je pro svoji malou toxicitu a velkou účinnost perspektivní látkou pro prevenci rakoviny a pro její léčbu v ranných stádiích.^{74, 76, 79)}

3. 4. 5. Sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní působení

Díky podobnosti fenylobenzopyronového jádra flavonoidů s benzodiazepiny je umožněno navázání flavonoidů na benzodiazepinové vazebné místo na GABA_A receptorech. Nejpevněji se váže wogonin.⁸⁰⁾ Tímto navázáním se otevře Cl⁻ kanál a dochází k hyperpolarizaci nervové buňky. K případné depolarizaci je pak potřeba daleko větší impuls. Wogonin je tedy zřejmě odpovědný za mírně sedativní působení drogy.

V pozdější studii se ukázalo, že wogonin má podobně jako benzodiazepiny výrazný anxiolytický efekt. Na rozdíl od nich má daleko nižší sedativní působení a nemá myorelaxační účinky.¹⁰⁰⁾ Ještě výraznější anxiolytickou aktivitu srovnatelnou s diazepinem vykázal flavonoid K36 (5,7,2'-trihydroxy-6,8-dimethoxyflavon), ani zde nebyly pozorovány účinky myorelaxační a dokonce ani sedativní. Z těchto výsledků je mimo jiné patrné, že substituce v poloze 2' výrazně zvyšuje anxiolytický účinek.¹⁰⁴⁾

Jiný flavonoid ze *S. baicalensis* - oroxylin A má také výraznou afinitu ke GABA_A receptoru, ale nezpůsobuje účinky jako wogonin nebo benzodiazepiny. Naopak působí jako antagonist, ruší jimi vyvolané

poruchy motorické koordinace a anxiolytický a myorelaxační účinek. Sedativní účinek benzodiazepinů není oroxylinem A ovlivněn.¹⁰²⁾

Byla prokázána i antikonvulsivní aktivita vodného extraktu kořene této rostliny. V pokusech na myších se ukázalo, že zatímco tonické křeče způsobené elektrošoky jsou extraktem inhibovány, u klonických křečí indukovaných pentylenetetrazolem je vliv extraktu malý. To znamená, že antikonvulzivní efekt není způsoben schopností interakce s benzodiazepinovým vazebným místem na GABA_A receptorech⁸¹⁾, ale spíše zabráněním šíření křečového záchvatu.⁸²⁾

3. 4. 6. Vliv na fibrinolytický systém

Flavonoidy z této rostliny mají vliv i na fibrinolytický systém. Inhibují trypsinem zvýšenou produkci PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) a zastavují redukci počtu t-PA (tissue-type plasminogen activator). Baicalein, na rozdíl od ostatních látek ze *Scutellaria baicalensis*, působí i když je produkce PAI-1 a redukce t-PA způsobena trombinem a peptidovým aktivátorem trombinových receptorů (TRAP - thrombin receptor activating peptide). Baicalein zároveň snižuje množství intracelulárního Ca²⁺ a zřejmě právě tímto mechanismem působí proti trombinu a TRAP.

Trombin a TRAP také indukují tvorbu ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) a ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) a baicalein produkci těchto látek hrajících roli při vzniku trombů inhibuje. Baicalein tedy může být potencionálním lékem pro léčbu trombóz a arteriosklerózy.^{83, 84, 85)}

3. 4. 7. Vasokonstrikční a vasodilatační účinky

U baicaleinu byl pozorován vliv na kontrakci a dilataci endothelu mesenterické arterie u myši. V malých koncentracích způsobuje kontrakci a inhibuje endothelium-dependentní relaxaci, pravděpodobně inhibicí produkce NO. Ve vyšších koncentracích (30 – 300 μM) arteriální hladká svalovina relaxuje. To je způsobeno inhibicí kontraktálního mechanismu prostřednictvím proteinkinasy C.⁸⁶⁾

Vliv na produkci NO byl později prokázán. Vodný extrakt *S. baicalensis* významně inhiboval iNOS (inducible nitric oxide synthase) a zároveň přímo vychytával NO radikály.⁹⁷⁾

3. 4. 8. Antialergické účinky

Na antialergickém účinku flavonoidů ze *Scutellaria baicalensis* se podílí jak efekt protizánětlivý, zprostředkovaný inhibicí lipoxygenasy, tak efekt imunomodulační. Mimo tyto mechanismy se na antialergickém účinku podílí i inhibicí produkce chemokinu eotaxinu, který je zodpovědný za zapojení eosinofilů do alergické reakce. Bylo zjištěno, že tyto flavonoidy zabraňují produkci eotaxinu přímo v aktivovaných fibroblastech (aktivovaných pomocí IL-4 a TNF- α), a to znemožněním jeho exprese.⁸⁷⁾

3. 4. 9. Vliv na další enzymové systémy

Baicalein je schopen inhibovat α -glukosidasu, což bylo prokázáno na krysím střevě. Pro shodnost enzymu a jeho biochemie u krys a člověka, dá se předpokládat stejný účinek i na lidskou α -glukosidasu.⁸⁸⁾

V další studii se ukázalo, že baicalein inhibuje enzym xanthinoxidasu.⁸⁹⁾ Tímto mechanismem může být omezena tvorba kyseliny močové v játrech a střevní sliznici. Baicalein je tedy i potenciálním lékem na dnu.

Byl také testován vliv baicalinu a baicaleinu na aktivitu aspartat-aminotransferasy.¹⁵³⁾ Bylo zjištěno, že obě látky silně snižují aktivitu tohoto enzymu, který je zodpovědný za konverzi aminokyselin na příslušné ketokyseliny a naopak.

Baicalin a zejména baicalein snižují zvýšené množství Ca^{2+} v gliových buňkách, které je způsobeno histaminem, noradrenalinem, nebo karcholem. Zároveň snižují histaminem indukovaný vzrůst množství inositolfosfátu. Z výsledků je zřejmé, že se tak děje inhibicí fosfolipasy C.⁹⁰⁾ Tento enzym svoji aktivitou zasahuje do celé řady dalších biochemických procesů. Jeho produkty například stimulují svalový stah, podporují množení buněk, ovlivňují syntézu glykogenu a svým rozkladem na kyselinu arachidonovou poskytují prekurzor pro tvorbu prostaglandinů. Baicalein by tak mohl mít mnohem komplexnější působení, než se původně předpokládalo.

3. 4. 10. Toxicita

Vedlejší účinky drogy nebyly zatím zcela poznány. Traduje se poškození jater po požití bylinných směsí obsahujících šišík, ale hepatotoxický efekt byl po bližším výzkumu vyvrácen. Poškození jater způsobila jiná složka (pravděpodobně germander z rostlin rodu *Teucrium*).^{6, 7)}

Wogonin má mírně mutagenní efekt, ale v rostlině není v takovém množství, aby se to projevilo. Vzhledem k této skutečnosti není doporučováno dlouhodobé užívání drogy.⁹¹⁾

Pro nedostatek údajů o toxicitě a farmakologii obsahových látek, není droga doporučována při těhotenství a laktaci, epilepsii a jiných poruchách CNS. Připouští se také možnost interakce s látkami ovlivňujícími CNS a kardiovaskulární systém.^{7, 92)}

3. 4. 11. Shrnutí biologických účinků

Farmakologické výzkumy potvrdily, že za pozitivní vliv drogy na celou řadu onemocnění jsou odpovědné flavonoidy. Zejména baicalin, jeho aglykon baicalein a wogonin mají účinky odpovídající tradičnímu používání drogy. Flavonoidy z rostliny *Scutellaria baicalensis* Georgii jsou skupinou látek s velmi širokou škálou biologických účinků. Baicalin a baicalein jsou pro svoji nízkou toxicitu potenciálními léky pro terapii a prevenci celé řady onemocnění. Velmi perspektivní je hlavně použití baicaleinu proti nádorům prostaty. Droga *Scutellariae radix* je proti těmto druhům rakoviny již používána, a to v kombinaci s jinými drogami v americkém přípravku PC-SPES. Zatím nepočetné studie, zabývající se tímto lékem, prokazují pozitivní efekt nejen proti rakovině prostaty, ale i proti některým typům rakoviny prsu a melanomů.^{93, 94, 95, 96)}

Tyto flavonoidy mají také prokazatelnou protizánětlivou, antioxidační, antihypertenzivní, antibakteriální a antivirivou aktivitu. Mohou být využity pro podpůrnou léčbu hypertenze, arteriosklerózy, prevenci vzniku trombóz, pro léčbu některých infekčních chorob, včetně AIDS. Použití izolovaných flavonoidů v humánní medicíně je předmětem dalších výzkumů a klinicko-toxikologických testů.

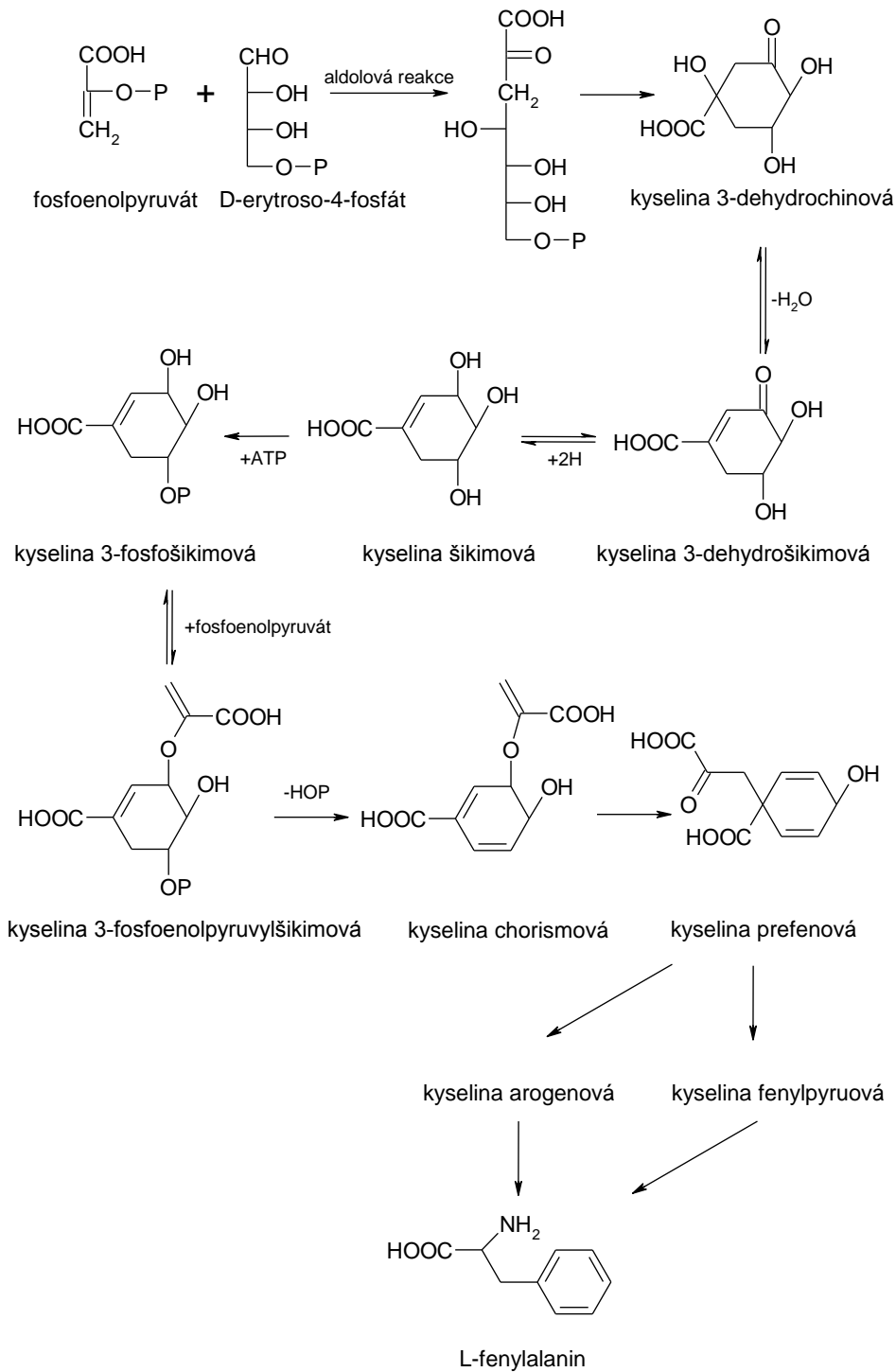
3. 5. Biosyntéza flavonoidů

Biosyntéza flavonoidů vychází z metabolismu kyseliny šikimové (obr. 2). Tato biosyntetická cesta je vyvinuta jen u mikroorganismů a rostlin, kde slouží k produkci aromatických aminokyselin.

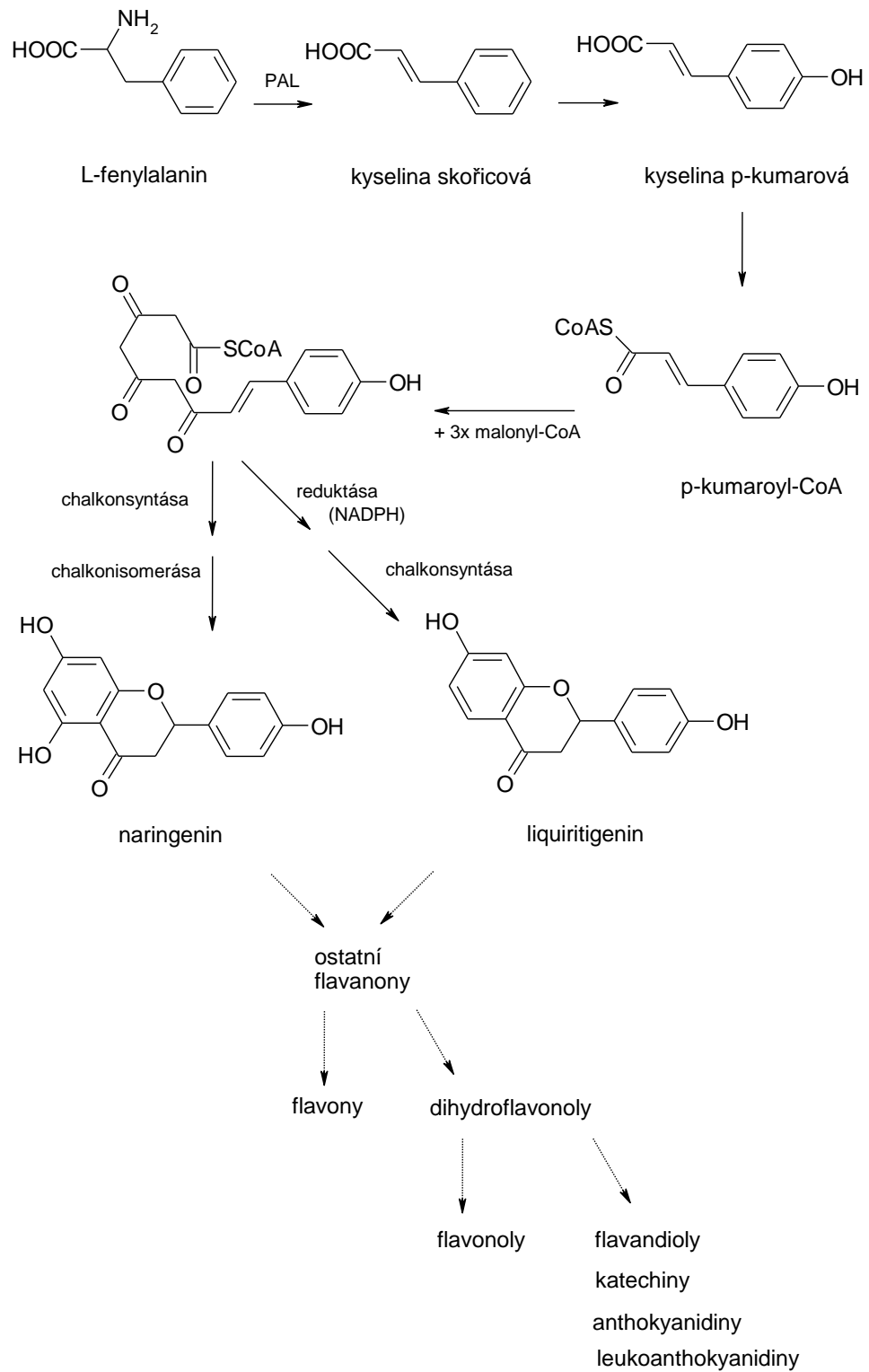
Z nich je pro syntézu flavonoidů klíčový L-fenylalanin, který se po eliminaci aminoskupiny pomocí PAL (phenylalanine ammonia lyase) mění na kyselinu skořicovou (obr. 3).

Po přeměně na *p*-kumarovou kyselinu a přijetí koenzymu A je molekula schopná reagovat se třemi molekulami malonyl-CoA pocházejícími z acetátové biosyntetické cesty. Tím vzniká molekula s polyketidickým řetězcem, která se pomocí chalkonsyntasy zacyklí a vytváří naringenin. Popřípadě předchází ještě redukce a vzniká liquiritigenin. Naringenin a liquiritigenin jsou dvě základní flavonoidní struktury.¹³⁹⁾

Obr. 2: Šikimátová bisyntetická cesta



Obr. 3: Biosyntéza flavonoidů



3. 5. Explantátové kultury rostlin

Biotechnologické metody dávají možnost kultivovat rostlinné buňky, pletiva, orgány i celé rostliny v podmínkách *in vitro*.

Tyto kultivace mimo jiné umožňují snadnější ovlivňování biochemických pochodů uvnitř buněk, což může vést například k zvýšené rychlosti růstu, zvýšení odolnosti vůči nepříznivým faktorům, nebo ke kumulaci většího množství látek primárního i sekundárního metabolismu.

Další předností explantátových kultur může být nezávislost na geografických a klimatických faktorech a jejich kultivace v plně kontrolovatelných a reprodukovatelných podmínkách. Získávaný produkt si zachovává stále stejnou kvalitu a jeho produkce může být rychle přizpůsobena poptávce.

Řada léčivých rostlin se pěstuje v politicky a ekonomicky nestabilních státech, a tak biotechnologická produkce odstraňuje i závislost na geopolitické situaci.

Z farmaceutického hlediska je významné především ovlivňování sekundárního metabolismu, protože řada rostlinných sekundárních metabolitů je unikátní a nevyskytuje se u živočichů nebo mikroorganismů. Navíc je s pomocí genetických manipulací možno produkovat i látky naprosto cizorodé.

Dále se explantátové kultury využívají při množení a šlechtění rostlin, při testování biologické aktivity některých látek jako například herbicidů, pesticidů, mutagenů, rostlinných bioregulátorů atp. Významná je též možnost používat *in vitro* kultury ve výzkumu jako systémy při studiu biochemických pochodů rostlinných buněk.

3. 5. 1. Odvození a druhy explantátových kultur

Díky totipotenci rostlinné buňky (to znamená, že buňka obsahuje genetickou informaci pro celou rostlinu a může se tedy pomocí postupné diferenciace regenerovat v celou fertilní rostlinu) je možné odvodit různé druhy explantátových kultur: od nediferencovaných kalusových kultur, přes suspenzní kultury, prýtové a kořenové kultury, embryonální kultury, až po klony původní intaktní rostliny¹⁵⁴⁾ (obr. 4):

kultury protoplastů – buňky bez pevné buněčné stěny (odstraněné většinou enzymaticky), pouze s cytoplasmatickou membránou

kultury buněčné – kultury jednotlivých buněk pomnožované v tekutém, polotuhém živném médiu, nebo na pevném nosiči nasyceným médiem

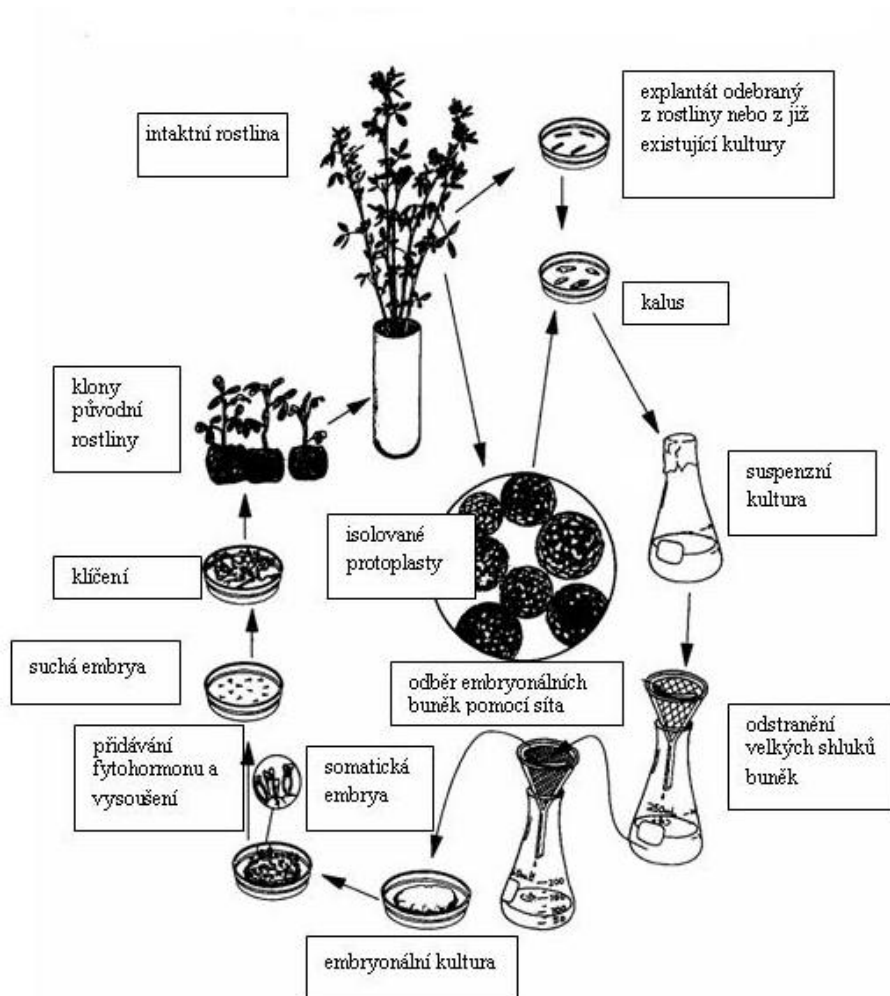
kultury suspenzní – suspenze volných buněk a malých buněčných shluků v tekutém médiu

kultury orgánové – diferencované orgány, nebo jejich části, které si zachovávají jejich stavbu a funkci. Patří sem například kořenové kultury.

kultury tkáňové – soudržné mnohobuněčné komplexy pletiva, kultivované většinou na pevných nebo polotuhých nosičích nasycených médiem

prašňikové kultury a kultury mikrospor – izolované prašňíky pěstované na pevném nebo v tekutém médiu.¹⁵⁵⁾

Obr. 4: Odvození kalusové a suspenzní kultury z intaktní rostliny a regenerace pomocí somatické embryogeneze.¹⁵⁴⁾



3. 5. 2. Kultivace explantátových kultur

Kultivace explantátových kultur probíhá ve sterilních podmínkách na živné půdě, která obsahuje všechny látky nezbytné pro život rostlinných buněk. Bylo vypracováno několik základních druhů živných médií, které jsou použitelné pro většinu explantátových kultur: médium podle Murashigeho a Skooga - tzv. MS¹²⁵⁾, médium podle Gamborga (B5)¹⁵⁶⁾, médium podle Schenka a Hildebrandta (SH)¹⁵⁷⁾ a některá další.

Základními složkami živného média jsou: *voda*, *zdroj uhlíku* (nejčastěji cukr nebo organická kyselina), *zdroj dusíku* (nitráty, amonné soli, aminokyseliny), *ostatní makroelementy* (fosfor, vápník, hořčík, draslík a síra, ve formě solí), *mikroelementy* (železo, mangan, měď, zinek, bor, molybden, kobalt a další), *vitaminy* (nejčastěji pyridoxin, thiamin, kyseliny nikotinová, biotin, myo-inositol), *nedefinované směsi přírodních látek* (organické extrakty jako hydrolyzát kaseinu, pepton, kokosové mléko, kvasnicový extrakt atd.), *regulátory růstu - fytohormony* (například indolyloctová kyselina, 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, naftyloctová kyselina, kinetin, 6-benzylaminopurin, kyselina abscisová).

Médium dále může obsahovat látku, která médium zpevňuje nebo jinak ovlivňuje reologické vlastnosti média. Nejčastěji se používá agar. Explantát je také možné pěstovat na můstcích z filtračního papíru, na plovoucích polopropustných membránách nebo v polyuretanové pěně.

Pro kultivaci kultur je třeba zajistit i vhodné fyzikální podmínky. Teplota se nejčastěji pohybuje v rozmezí od 17 do 25°C, intenzita osvětlení od 2000 do 5000 luxů. Explantátové kultury mohou být fotoautotrofní, fotomixotrofní i heterotrofní, takže závislost kultur na světle se může lišit případ od případu (viz kapitola 3. 6. 2.).

Kultivace v tekutých živných půdách vyžaduje také míchání. Při nedostatečném míchání dochází k sedimentaci buněk, k jejich shlukování a také k malému přísunu kyslíku. Naopak při příliš intenzivním míchání dochází k mechanickému poškozování buněk.

3. 6. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů

Jedním ze základních požadavků na explantátové kultury je ekonomicky výhodnější produkce sekundárních metabolitů ve srovnání s klasickými postupy. Zatím neexistuje univerzální postup pro získání vysoce produkční kultury z její matečné rostliny. U každého druhu se postupuje individuálně, což je dáno rozdílnými potřebami rostlin a faktory ovlivňujícími růst a produkci sekundárních metabolitů. Byly však vypracovány některé metody, které jsou použitelné u většiny explantátových kultur.

3. 6. 1. Výběr rostlinného materiálu a selekce

Teoreticky je možné z kterékoli části rostliny odvodit kalusovou kulturu (a následně tedy i jiné typy explantátových kultur). Ve skutečnosti ovšem záleží na druhu rostliny. Například jednoděložné rostliny ve srovnání s dvouděložnými mají nižší schopnost utvářet kalus, kalusy dřevin zase obvykle rostou mnohem pomaleji. První možností ovlivnění produkce sekundárních metabolitů je tedy výběr vhodných částí k odvození kultur *in vitro* a následná selekce kultur s nejrychlejším nárůstem biomasy a s nejvyššími obsahy požadovaných metabolitů.

Produkce sekundárních metabolitů je také ovlivněna stářím kultur (s narůstajícím počtem pasáží obvykle klesá), obdobím jejich kultivační periody (nejvyšší zpravidla na konci proliferačního období) a stupněm diferenciacce buněk.

3. 6. 2. Kultivační podmínky

Kultivační podmínky hrají významnou roli v pěstování explantátových kultur a pro jednotlivé rostlinné druhy se často liší.

Jednou z možností jak zvýšit množství produktů je použití vhodného složení živného média. Živné médium musí mít kromě zdroje energie, esenciálních aminokyselin, anorganických solí, zdrojů uhlíku a dalších látek i vhodnou kombinaci fytohormonů (viz kapitola 3. 5. 2.). Jako auxin se nejčastěji používá 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina) a NAA (naftylacetová kyselina), a to v koncentracích mezi 0,1 a 50 $\mu\text{M.l}^{-1}$. Méně často je používán i jeden z cytokininů: kinetin nebo BAP (6-benzylaminopurin).

Produkcí sekundárních metabolitů také ovlivňuje teplota, pH a intenzita světla.

Teplota pro kultivaci se obvykle pohybuje mezi 17 a 25 °C. Podle některých výzkumů může i snižování teploty pod 17 °C vést k pozitivnímu ovlivnění metabolismu (zvýšené množství mastných kyselin a látek z metabolismu mastných kyselin vycházejících).¹⁰⁵⁾

Hodnota pH je obvykle udržována mezi 5 a 6 (před autoklávováním). Je-li mimo toto rozmezí, obvykle je zpomalen růst kultury. Na druhou stranu, vhodnou úpravou pH je možno zvýšit stabilitu některých metabolitů nebo zlepšit vylučování některých látek do média a tím usnadnit následnou izolaci.

Vliv světla na množství sledovaných metabolitů je velmi variabilní. Existují skupiny látek, jejichž produkci světlo inhibuje a naopak látky, na které světlo působí silně stimulačně. Může též záležet na části rostliny, ze které byla kultura odvozena.¹⁰⁶⁾

V moderních bioreaktorech je možné ovlivňovat též množství O_2 , CO_2 a jiných plynů, včetně způsobu jakým se do kultivační nádoby

dostávají (přestupem přes membránu, nebo probubláváním), dá se též optimalizovat tvar míchadel a rychlost míchání.

3. 6. 3. Prekurzory

Produkce sekundárních metabolitů může být někdy stimulována přidáním prekurzoru do živného média. Předpokladem je, že potenciální prekurzor je schopen se dostat z média do buňky, respektive do organel, ve kterých probíhá biosyntéza příslušné metabolické cesty. Kromě toho může být důležitá také koncentrace prekurzoru a doba jeho aplikace. Tato metoda je samozřejmě výhodná pouze v případě, že prekurzor je podstatně levnější než produkt. Nejčastěji tedy jako prekurzory slouží aminokyseliny z nichž příslušná metabolická cesta vychází. Úspěšné použití aminokyselin jako prekurzorů tropanových a indolových alkaloidů je známé už od šedesátých let.¹¹⁸⁾

Jedním z příkladů úspěšného použití prekurzoru je přidávání fenylalaninu do média kultur *Taxus cupsidata*, ve kterých byla tímto způsobem zvýšena produkce taxolu.¹⁰⁷⁾ Fenylalanin se jako prekurzor osvědčil i u suspenzních kultur *Salvia officinalis*, které po jeho přidání produkovaly více kyseliny rozmarýnové.¹¹⁶⁾

3. 6. 4. Biotransformace

K biotransformačním reakcím patří ty, které jsou katalyzovány rostlinnými buňkami, orgány nebo enzymy.

K rostlinnému materiálu je přidán exogenní substrát, který je však rostlinou buňkou (orgánem) přijat a zapojen do metabolických procesů. Působením jednoho či více enzymů rostliny je přeměněn na výsledný produkt. Tento postup je běžně využíván při mikrobiálních fermentacích

a i u rostlinných kultur se zdá být velmi perspektivní. Zejména u těch reakcí a enzymů, které se vyskytují pouze v rostlinné říši.

Rostlinné enzymy jsou schopny katalyzovat celou řadu reakcí: hydroxylace^{105, 108}), glukosylace¹⁰⁹), oxidačně-redukční reakce (hlavně oxidace alkoholů na ketony¹¹⁰), a naopak redukce karbonylových skupin¹¹¹), redukce dvojných vazeb¹¹²), redukce nitroskupin¹¹³), hydrolýzy¹¹⁴), epoxidační reakce¹¹⁵), a mnohé další. Biotransformace přináší výhodu zejména u reakcí regio- a stereo-specifických, které jsou náročné na provedení běžnými chemickými postupy. Biotransformační reakce navíc nevyžadují ani extrémní pH nebo teplotu.

3. 6. 5. Elicitace

Elicitace je proces využívající schopnosti rostlin i rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty. Elicitor je látka nebo děj, který takový stres vyvolává a spouští obrannou reakci rostlinné buňky.

V závislosti na původu se elicitory dělí na abiotické a biotické. Mezi elicitory abiotické lze zahrnout jak některé fyzikální faktory (např.: změny teploty, osmotického tlaku, pH, UV záření), tak různé chemické látky (toxické kovy, pesticidy, herbicidy, antibiotika). Biotickými elicitory jsou viry, bakterie, houby, kvasinky, jejich části (např. fragmenty buněčných stěn), nebo látky z nich získané.^{119, 120}

Primární reakcí u elicitace biotickým elicitorem je rozpoznání elicitoru rostlinnou buňkou jeho navázáním na specifický membránový protein na plasmatické membráně. Po této aktivaci receptoru dojde k přenosu signálu do intracelulárního prostoru buňky pomocí přenašečů (second messengers). Tento přenos je možný hned několika systémy:

- systém cAMP, který spočívá v navázání guanosin trifosfátu na G-protein. Ten pak aktivuje ATP-asu a vzniká cAMP, který mění aktivity proteinkinás a fosfatás. Následná fosforylace/defosforylace řady intracelulárních enzymů vede ke změně metabolismu buňky.
- systém fosfoinozitudový začíná hydrolýzou membránových lipidů fosfolipásou C na dvě signální molekuly inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). Zatímco DAG přímo přes proteinkinázy ovlivňuje fosforylaci proteinů, IP₃ působí přes další nosiče signálu (Ca²⁺, kalmodulin) a kromě fosforylace proteinů ovlivňuje i expresi genů.
- systém reaktivních forem kyslíku spočívá jednak v přímém působení kyslíkových radikálů na expresi genu, tak v působení přes peroxidaci membránových lipidů a tvorbu kyseliny jasmonové a methyljasmonát, které následně ovlivňují transkripci.
- systém tvorby ethylenu a další systémy, zatím nedostatečně prozkoumané (např. změny elektrochemického potenciálu způsobené změnou přestupu některých iontů).^{120, 121, 122)}

Vlastní obranná reakce po přenosu signálu spočívá ve změně metabolismu buňky. Pomocí elicitoru dojde ke krátkodobému a přechodnému zvýšení hladiny enzymů nebo k jejich aktivaci a k následné produkci a akumulaci obranných látek, které pomáhají vzniklý stres eliminovat. Tato změna se může projevit v syntéze specifických stresových proteinů, což mohou být například hydrolasy napadající buněčnou stěnu patogenu, osmoregulační látky, látky podílející se na tvorbě a odstraňování aktivních forem kyslíku, peroxidasy, antioxidační sloučeniny.

Kromě těchto stresových proteinových látek může být iniciována syntéza nízkomolekulárních látek sekundárního metabolismu majících další ochranné funkce (fytoncidy, fytoalexiny, fytoanticipiny). Tyto obranné látky bývají druhově specifické a patří mezi ně látky jako terpeny, flavonoidy, stilbeny, steroidy, antraceny a další.^{120, 121, 123)}

3. 6. 6. Imobilizace

Imobilizace buněk na povrchu polymerové matrice, popřípadě přímo v ní, má často za výsledek zvýšení produkce sekundárních metabolitů v porovnání se suspenzními kulturami. Imobilizace se děje ukotvením rostlinných buněk na povrchu nosiče (nosič může mít podobu částic, sítě nebo pěny), zachycením uvnitř gelových částic nebo například obalením buněk membránovou strukturou. Imobilizace buněk ještě není v rostlinné biotechnologii tak využívána jako v biotechnologii mikrobiální, ale ukazuje se, že i zde má mnohé výhody. Imobilizované buňky mají delší životnost a dají se prodloužit kultivační periody. Jestliže je produkt uvolňován do média, zjednoduší se následné izolační procesy. Imobilizace může někdy vést k větší diferenciaci buněk a k produkci látek, které jsou na této diferenciaci závislé. Znemožňuje též přílišnému nárůstu viskozity, jako je tomu u normálních suspenzních kultur (toto zvýšení viskozity následně vede k problémům s mícháním a vzdušněním).

Imobilizace přináší i řadu nevýhod, díky kterým není zatím u rostlinných kultur běžně využívána (extracelulární degradace produktu, ukotvení buněk vytváří další bariéry pro difúzi, imobilizace limituje růst kultur atp.).¹²⁴⁾

3. 6. 7. Genetické manipulace

Genetické manipulace spočívají v izolaci a charakterizaci genetického materiálu a jeho následné úpravě a transferu zpět do organismu nebo do buněčných kultur. V případě zvýšení produkce sekundárních metabolitů u rostlin jsou používány dvě základní metody. První mění expresi jednoho nebo několika genů kódujících klíčové kroky biosyntézy, nebo těch, které zastavují kompetitivní metabolické cesty, popřípadě snižují katabolismus produktů. Druhá metoda je zaměřena na změnu exprese regulatorních genů, které kontrolují geny příslušné biosyntetické cesty.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

- methanol pro HPLC, L-fenylalanin biochem., kyselina skořicová č., kyselina malonová puriss.: Fluka, Buchs;
- octan měďnatý č.: Merck, Darmstadt;
- baicalin č., baicalein č., Pluronic F-68, malonan sodný č., skořican sodný č.: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim;
- kyselina α -naftyloctová č., myoinositol puriss.: Sigma, St. Luis;
- chlorid thiaminia puriss., chlorid pyridoxinia puriss.: Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook Hampshire;
- methylcelulosa 450: Lachema, Blansko;
- enzymatický hydrolyzát kaseinu: Imuna, Šarišské Michalany;
- kinetin p.a., kyselina 2,4- dichlorfenoxyoctová p.a.: Serva, Heidelberg;
- 6-benzylaminopurin pro zvláštní účely, dihydrofosforečnan draselný č., dusičnan draselný p.a., dusičnan amonný p.a., glycin č., hydrogenfosforečnan sodný p.a., chlorid kobalnatý p.a., chlorid vápenatý p.a., jodid draselný p.a., kyselina boritá p.a., kyselina o-fosforečná č., kyselina nikotinová č., methanol p.a., methylenová modř pro mikro., molybdenan sodný p.a., petrolether p.a., sacharosa p.a., síran hořečnatý p.a., síran manganatý p.a., síran měďnatý p.a., síran zinečnatý p.a., síran železnatý p.a.: Lachema, Brno.

4. 1. 2. Přístroje a chromatografické doplňky

- autokláv PS 20A, autokláv PS 121, horkovzdušný sterilizátor HS 81A, Chirana, Brno;
- analytické váhy A 200S: Sartorius, Göttingen;
- vakuová rotační odparka UNIPAN 350: Unipan, Wroclaw;
- vakuová rotační odparka LABOROTA 4002, Heidolph, Schwabach;
- roller: vývojové dílny AV ČR, Praha;
- box s laminárním prouděním Fatran L-F: výrobné družstvo Pokrok, Žilina;
- vodní lázeň KL: Laboratorní přístroje, Praha
- mikroskop Meopta standard, Meopta, Přerov
- HPLC chromatograf UNICAM CRYSTAL (čerpadlo Crystal 200, diodový detektor Crystal 250, autosampler Crystal 230): Unicam Analytical Systems, Cambridge;
- HPLC chromatograf JASCO (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015): Jasco International, Tokyo;
- chromatografické kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m) s předkolumnou: Merck, Darmstadt;
- bioreaktor BIOSTAT B-DCU, třepačka CEROMAT MO: B. Braun Biotech. International, Melsungen;

4. 1. Založení a kultivace *in vitro* kultur *S. baicalensis*

4. 1. 1. Založení kalusové kultury

K založení explantátových kultur šišáku bajkalského byla použita semena získaná ze střediska léčivých rostlin lékařské fakulty Masarykovy university v Brně.

Po povrchové sterilizaci semen 70 % lihem (10 min), roztokem SAVO (10 min) a následném omytí sterilní vodou byla semena vysazena ve sterilních podmínkách na povrch agarového média (za tepla připravený a následně zchlazený 0,9 % roztok agaru ve vodě). Z vyklíčených rostlinek o velikost rostlin asi 10 cm byly odebrány řezy z kořenů a ty přesazeny na agarové médium s obsahem kokosového mléka (10 %). Kalusy tvořené na řezech kořenů byly odebírány a přesazovány na médium podle Murashigeho a Skooga (MS médium).¹²⁵⁾ Tyto kalusy byly kultivovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách s papírovými můstky při teplotě 25°C a 16h světelné periodě (intenzita světla cca 3500 lux).

4. 1. 2. Pasážování

Pravidelné pasážování kalusových kultur bylo prováděno v intervalu 28 -30 dní a provádělo se v boxu s laminárním prouděním vzduchu, jehož vnitřní povrch byl předem omyt 96 % ethanolem a ozařován germicidní zářivkou. Při práci byly dodržovány zásady práce v aseptickém prostředí. Nástroje (pinzety, skalpely) byly po očištění, opláchnutí ethanolem a obalení hliníkovou fólií sterilizovány 2 hodiny při 200°C v horkovzdušném sterilizátoru. Erlenmayerovy baňky

s papírovým knotem a s 30 ml MS média uzavřené hliníkovou fólií byly sterilizovány po dobu 15 minut při 120°C v parním autoklávu.

Samotné pasážování spočívalo v mechanickém přenesení částí vzrostlých kalusových kultur pomocí pinzety do připravených baněk s živným médiem.

4. 1. 3. Živné médium

Kalusové kultury šišáku bajkalského byly kultivovány na půdě podle Murashigeho a Skooga, jejíž složení je následující:

CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00 mg.l ⁻¹
KNO ₃	1900,00 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00 mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,00 mg.l ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,84 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,37 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,20 mg.l ⁻¹
KI	0,83 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
inositol	100,00 mg.l ⁻¹
hydrolyzát kaseinu	1000,00 mg.l ⁻¹
glycin	2,00 mg.l ⁻¹

kyselina nikotinová	0,50 mg.l ⁻¹
thiamin hydrochlorid	0,10 mg.l ⁻¹
pyridoxin hydrochlorid	0,50 mg.l ⁻¹
sacharóza	30000,00 mg.l ⁻¹

Tato množství byla odvážena na analytických vahách, látky potřebné v malém množství byly odpipetovány ze zásobních roztoků. Od 6. pasáže po testování vlivu rostlinných hormonů (viz kapitola 5.2.) byla jako růstový stimulant používána NAA v koncentraci 10 mg.l⁻¹.

4. 1. 4. Odvození a kultivace suspenzních a kořenových kultur

Suspenzní kultury byly odvozeny z 9. pasáže kultur kalusových mechanickým rozvolněním částí kalusů ve 25 ml MS média obsahujícího NAA (10 mg.l⁻¹). Kultivace probíhala v 250 ml kulatých baňkách s plochým dnem na rolleru, v pozdějších pasážích na rotační třepačce (120 ot.min⁻¹). Původní objem média byl 25 ml a kultivační perioda 20 – 22 dní, ale po zavedení třepačky místo rolleru bylo možno zvětšit objem média v baňkách na 50 ml a vzhledem k rychlejšímu růstu kultur byl i zkrácen kultivační interval na 12-14 dní.

Pasážování suspenzních kultur bylo prováděno pomocí sterilních pipet (sterilizace v autoklávu po vsunutí chomáčku vaty, obalení v hliníkové fólii, 15 minut, 120°C)

Kořenové kultury byly odvozeny použitím kinetinu (1 mg.l⁻¹), který v kalusových kulturách indukoval růst deformovaných kořenů. Jejich několikanásobnou selekcí vznikla čistá kořenová kultura bez kalusového pletiva. Následná kultivace těchto kultur probíhala na MS médiu bez přítomnosti fytohormonů. Vzhledem k pomalejšímu růstu byly pasážovány v intervalu 35 – 40 dní.

4. 2. HPLC analýza baicalinu a baicaleinu

4. 2. 1. Příprava vzorků

Vzorky kalusových a kořenových kultur byly nejprve vyjmuty z baněk, předsušeny na filtračním papíře při laboratorní teplotě po dobu asi 24h a poté dosušeny v sušárně při 50°C. U suspenzních kultur předcházela celé proceduře filtrace a promytí buněk vodou.

Sušený materiál byl posléze rozdrobněn pomocí třenky a těrky a extrahován: vzorek 0,200 g rostlinného materiálu byl dvakrát extrahován 10 ml 80 % methanolu na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 30 min. Objem byl po extrakci doplněn na 20 ml 80 % methanolem. Chlorofyl a lipidy byly odstraněny několikanásobným třepáním s petroléterem. Poté byly vzorky zfiltrány přes teflonový mikrofiltr (0,45 μm) a připraveny k HPLC analýze.

Pro stanovení baicalinu a baicaleinu v živném médium bylo vzhledem k malým obsahům těchto látek nutno nejdříve redukovat větší objem média (100 ml) na méně než 5 ml pomocí rotační vakuové odparky. K tomuto zbytkovému množství bylo přidáno 15 ml methanolu a po dokonalém promísení byl methanolem doplněn objem na 20 ml. Vzorek byl poté zfiltrován mikrofiltrem (0,45 μm).

4. 2. 2. HPLC analýza

HPLC analýzy byly první tři roky prováděny na chromatografické sestavě Unicam Crystal (čerpadlo Unicam Crystal 200, autosampler Unicam Crystal 230, DAD detektor Unicam Crystal 250), poté na sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler Unicam Crystal 230).

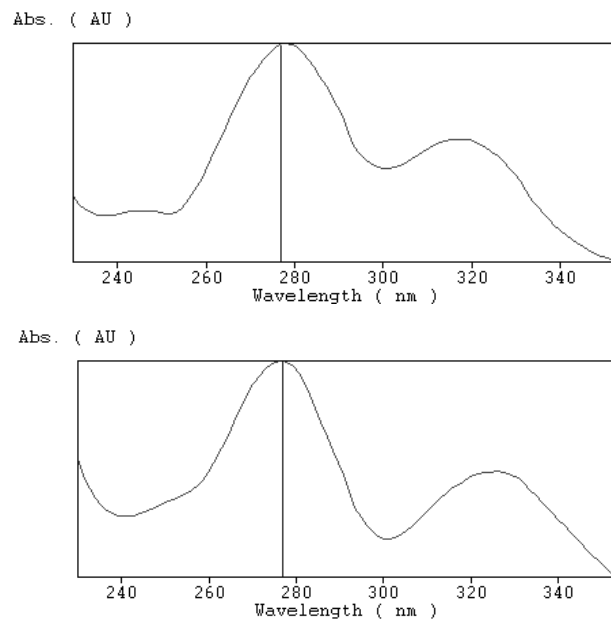
Obě sestavy byly vybavené předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m) s ochranou předkolumnkou.

Nastříkovaný objem byl 20 μ l. Složení mobilní fáze probíhalo v lineárním gradientu z 50 % methanolu s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné (pH = 2,9) v čase $t = 0$ min na 75 % methanol (s 0,15 % kyseliny fosforečné) v čase $t = 15$ min., při konstantním průtoku mobilní fáze 1,2 ml.min⁻¹.

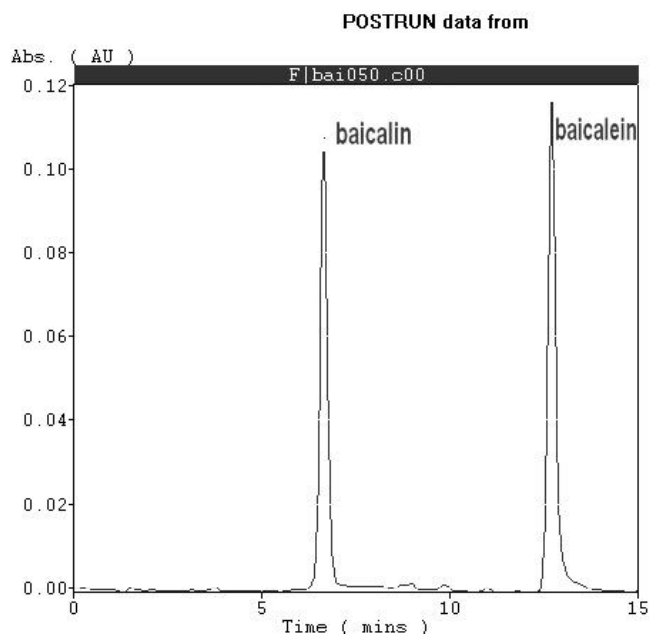
Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190 - 450 nm. Obsah sledovaných flavonoidů byl vypočten z píků při vlnové délce 277 nm, ve které mají oba flavonoidy své absorpční maximum. Retenční časy u baicalinu byly cca 6 min. 33 sec., u baicaleinu cca 13 min. 08 sec. Obsah obou látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Absorpční spektra baicalinu a baicaleinu ukazuje obrázek č. 5. Ukázky chromatogramů standardu a vzorku jsou na obr. č. 6 a 7.

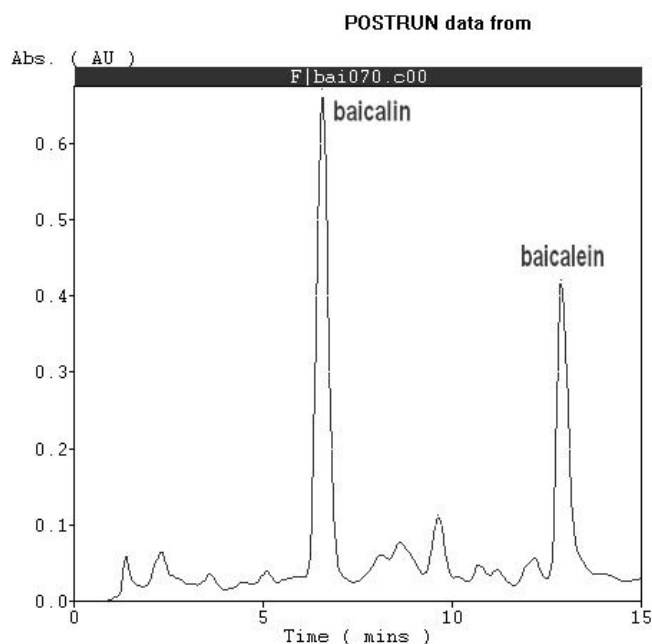
Obr. 5: Absorpční spektrum baicalinu (nahore) a baicaleinu (dole). Je zvýrazněna vlnová délka 277 nm, při které bylo prováděno měření.



Obr. 6: Ukázka chromatogramu standardů baicalinu a baicaleinu.



Obr. 7: Ukázka chromatogramu vzorku připraveného z *in vitro* kultury.



4. 2. 3. Validace HPLC analýzy

Validace znamená ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody).

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco, Unicam) a to normou ISO 9001 (International Organization for Standardization).

Způsobilst chromatografických systémů byla navíc ověřena *testem opakovaného nástřiku* – tzv. *test na přesnost* (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a *testem linearity* (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r , která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékpisu, 3. vydání ¹²⁶: *Asymetrie piku a Počet teoretických pater*.

Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry:

Správnost metody - jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem).^{127, 128, 129)}

Kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %).^{127, 128, 129)}

4. 3. Optimalizace kultivačních podmínek

4. 3. 1. Sledování vlivu fytohormonů na kultury *S. baicalensis*

U kalusových kultur šišáku bajkalského byl sledován vliv rostlinných hormonů na rychlost růstu a obsah flavonoidů baicalinu a baicaleinu.

K pokusům byla použita šestá pasáž kalusové kultury *Scutellaria baicalensis*. Kalusové kultury byly kultivovány na kultivačním MS médiu s přidavkem vždy jednoho z následujících fytohormonů: kinetin (v koncentraci $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), BAP ($c = 2 \text{ mg.l}^{-1}$), NAA ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$), 2,4-D ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$). Jako kontrola byly použity kultury rostoucí na půdě bez přidavku rostlinných hormonů

V průběhu kultivace bylo sledováno množství sušiny a množství flavonoidů baicaleinu a baicalinu.

Vzorky ke stanovení sušiny byly odebírány vždy po 7 dnech. Pro každý soubor bylo z jednotlivých baněk odebráno pět kalusů, které byly

samostatně usušeny a zváženy. Ze získaných hodnot byla vytvořena růstová křivka jako závislost suché hmotnosti kalusu na stáří kultury.

Po 28 dnech kultivace byly odebrány též vzorky pro stanovení baicalinu a baicaleinu, které byly po usušení a extrakci byly analyzovány metodou HPLC. Analyzováno bylo též živné médium.

4. 2. 2. Sledování vlivu délky osvětlení na kultury *S. baicalensis*

K pokusům byly použity jednoleté kalusové a kořenové kultury *Scutellaria baicalensis* Georgii, které byly kultivovány na živném MS médiu s přidavkem NAA v množství 10 mg na 1 l média.

První část kultur obou typů byla udržována v prostředí stálého osvětlení o intenzitě přibližně 3500 luxů, druhá část byla kultivována v permanentní tmě a třetí - kontrolní část v prostředí 16 hodinové denní světelné periody.

Vždy po 5 dnech byly odebírány vzorky ke stanovení sušiny. Pro každý soubor byly z jednotlivých baněk odebrány tři kalusy (respektive kořenové kultury), které byly samostatně usušeny a zváženy. Ze získaných dat byla vytvořena růstová křivka pro jednotlivé světelné podmínky a to jako závislost suché hmotnosti kalusu (kořenové kultury) na stáří kultury.

Po 28 dnech kultivace byly odebrány vzorky kalusů, kořenových kultur a živných médií pro stanovení baicalinu a baicaleinu metodou HPLC.

4. 3. Vliv potenciálních prekurzorů

Byl sledován vliv potenciálních prekurzorů na produkci baicalinu a baicaleinu v kalusových a suspenzních kulturách šišáku bajkalského.

Na konci kultivační periody (u kalusových kultur 28. den, u suspenzních 20. den) byl ke kulturám přidán potenciální prekurzor ve třech různých koncentracích. U všech prekurzorů byly koncentrace dosažené v médiu následující: 1 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹ a 10 mg.l⁻¹.

Použitými prekurzory byly:

L-fenylalanin (L-Phe)

Kyselina skořicová (CIN)

Skořican sodný (CINNa)

Kyselina malonová (MAL)

Malonan sodný (MALNa)

Prekurzor byl přidáván vždy po 1 ml ze sterilních zásobních roztoků. Ke kulturám sloužícím jako kontrola byl přidán 1 ml sterilní destilované vody.

Následná kultivace probíhala při 16 h světelné periodě a 25°C. Po 20 a 40 hodinách od přidání prekurzoru byly odebrány vzorky (vždy tři od každé koncentrace), usušeny a analyzovány pomocí HPLC.

4. 4. Vliv elicitace reakivními formami kyslíku

4. 4. 1. Sledování vlivu methylenové modři

Byla sledována produkce sekundárních metabolitů v kalusových a suspenzních kulturách po elicitaci radikálem kyslíku, vytvářeného přímo v médiu pomocí methylenové modři.

K suspenzním a kalusovým kulturám byla na konci jejich kultivační periody přidávána methylenová modř. Tento elicitor byl přidáván vždy po 1 ml ze sterilních zásobních roztoků. a to tak, aby konečná koncentrace v médiu byla 1, 10, a 100 mg.l⁻¹. Ke kulturám sloužícím jako kontrola byl přidán 1 ml sterilní vody.

Následná kultivace probíhala při 16 h světelné periodě a 25°C. Po 8 a 24 hodinách kultivace byly odebrány vzorky kultur a po usušení a extrakci byl metodou HPLC stanoven obsah baicaleinu a baicalinu.

4. 4. 2. Sledování vlivu peroxidu vodíku

Touto abiotickou elicitací by učiněn pokus pozitivně ovlivnit produkci baicalinu a baicaleinu v kalusových a suspenzních kulturách šiřáku bajkalského.

K suspenzním a kalusovým kulturám kulturám byl na konci jejich kultivační periody přidáván jako elicitor peroxid vodíku. Tento elicitor byl přidáván vždy po 1 ml ze zásobních roztoků tak, aby konečné koncentrace v médiu byly: 50, 100, 500 a 1000 mg.l⁻¹. Ke kulturám sloužícím jako kontrola byl přidán 1 ml sterilní vody.

Po 8 a 24 hodinách kultivace byly odebrány vzorky kultur a metodou HPLC stanoven obsah baicaleinu a baicalinu.

4. 5. Vliv elicítace těžkými kovy

4. 5. 1. Sledování vlivu měďnatých iontů

K ovlivnění produkce baicalinu a baicaleinu byla zvolena i elicítace octanem měďnatým. Ze sterilních zásobních roztoků byl k narostlým kalusovým a suspenzním kulturám na konci kultivační periody přidáván vždy 1 ml roztoku octanu měďnatého. Výsledné koncentrace octanu měďnatého v médiu byly: 1, 10 a 100 mg.l⁻¹, což po přepočtu odpovídá 0,35 mg.l⁻¹, 3,5 mg.l⁻¹ a 35 mg.l⁻¹ Cu²⁺. Ke kontrolním kulturám byl přidán 1 ml sterilní vody.

Elicítované i kontrolní kultury byly odebírány po 8 a 24 hodinách od aplikace prekurzoru a metodou HPLC bylo stanoveno množství baicalinu a baicaleinu.

4. 6. Kultivace suspenzní kultury v laboratorním bioreaktoru

4. 6. 1. Příprava bioreaktoru

Laboratorní bioreaktor byl před každou kultivací připraven podle následujícího postupu:

Kultivační nádoba byla naplněna 1,6 l MS média s obsahem NAA (10 mg.l⁻¹) a pevně uzavřena víkem s instalacemi pro vedení plynů a kapalin, odběr vzorků a s míchadlem. Po kalibraci byla namontována pH sonda a následně byly instalovány i další měřící sondy (pO₂, teplotní sonda, sonda pro měření objemu média a indikátor pěny). Poté byly napojeny veškeré spojovací prvky, mikrofiltry a zásobní láhev s vodou.

Před sterilizací byla do pláště nádoby napuštěna voda a byla označena výška hladiny média v nádobě. Sterilizace uzavřené kultivační nádoby probíhala při 120°C a 0,1 MPa po dobu 30 minut.

Po sterilizaci a zchladnutí na laboratorní teplotu byla nádoba připojena k ovládacím prvkům. V případě potřeby byla doplněna hladina kultivačního média sterilní vodou ze zásobní láhve. Následně byla provedena kalibrace kyslíkové sondy.

Nakonec byly pomocí ovládacích prvků nastaveny výchozí podmínky pro kultivaci (teplota, pH, pO₂)

4. 6. 2. Inokulace, kultivace a odběr vzorků

Inokulace probíhala po odpojení od ovládacích prvků ve sterilním boxu.

Po omytí víka kultivační nádoby 96 % ethanolem byla kultivační nádoba přenesena do připraveného sterilního boxu. Inokulace byla prováděna prostým nalitím přibližně 400 ml 14 dní staré suspenzní kultury do kultivační nádoby přes univerzální port.

Poté byla nádoba opět připojena k ovládacím prvkům, na kterých byl spuštěn ovládací software s předem připravenou metodou. Detailní postupy při programování metod vycházely z manuálů pro přístroj BIOSTAT B-DCU.

Odběr vzorků byl prováděn pomocí speciálního portu, zachovávajícího sterilní podmínky kultivace.

4. 6. 3. Stanovení sušiny

Ke stanovení suché hmotnosti buněk v kultivační nádobě bioreaktoru byly odebrány vždy 3 vzorky po 50 ml. Tyto vzorky byly za

sníženého tlaku zfiltrovány přes předem vysušený a zvážený filtr. Na filtru byly třikrát promyty 20 ml destilované vody a i s filtrem usušeny. Množství sušiny pak bylo vypočteno z rozdílů hmotností prázdného filtru a filtru se vzorkem. Množství sušiny bylo přepočteno na 1 litr média.

4. 6. 4. Optimalizace kultivačních podmínek

Pro převod suspenzních kultur z baněk do bioreaktoru bylo třeba optimalizovat kultivační podmínky. Některé hodnoty byly bez jakýchkoli problémů převzaty z kultivace v baňkách (teplota), některé byly testovány, ale jejich změna nepřinesla žádný efekt (světelné podmínky, pH). Kultivační podmínky jako rychlost míchání a rychlost vzdušnění museli být vzhledem k odlišným principům v obou typech kultivací experimentálně stanoveny. Dále byl testován vliv některých protektivních látek, které pomáhají eliminovat střížné síly (methylcelulóza v koncentraci 0,5 %, Pluronic F-68 v koncentracích 0,1 a 0,2%).^{148,149)}

4. 7. Statistické zpracování výsledků

Statistická významnost naměřených výsledků byla vypočítána pomocí *t-testu významnosti rozdílu dvou průměrů* (pro rovnost rozptylů) podle následujících matematických vztahů:

Aritmetický průměr:

$$x = \frac{\sum_{i=1}^a x_i}{a}$$

kde x_i = naměřené hodnoty, a = rozsah souboru

Směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^a (x - x_i)^2}{a - 1}}$$

kde x = aritmetický průměr, x_i = naměřené hodnoty, a = rozsah souboru

Testovací kritérium:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{a_1 \cdot s_1^2 + a_2 \cdot s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{a_1 a_2 (a_1 + a_2 - 2)}{a_1 + a_2}}$$

kde x_1 = aritmetický průměr kontrolního souboru, x_2 = aritmetický průměr pokusného souboru, s_1 = směrodatná odchylka kontrolního souboru, s_2 = směrodatná odchylka pokusného souboru, a_1 = počet členů kontrolního souboru, a_2 = počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se *stupněm volnosti* vypočteným podle vzorce:

$$v = a_1 + a_2 - 2$$

Pokusný soubor se od kontrolního souboru statisticky významně liší v případě, že vypočtené testovací kritérium t je větší než kritická hodnota t_p pro vypočtený stupeň volnosti v na hladině významnosti p ($p = 0,05$).¹³⁰⁾

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Založení a kultivace explantátových kultur *S. baicalensis*

Po odvození kalusové kultury výše popsanou metodou (kapitola 4.1.) byla během prvních čtyř pasáží patrná diferenciací buněk (tvorba deformovaných kořenů i zelených částí). Tvořící se kalusové pletivo bylo nejdříve hnědě zbarvené, ale s přibývajícímí pasážemi přecházelo do výrazně zelené barvy. V páté pasáži již byly získány čistě kalusové kultury, bez zřetelné diferenciací, pouze se zbytkovou tvorbou chlorofylu.

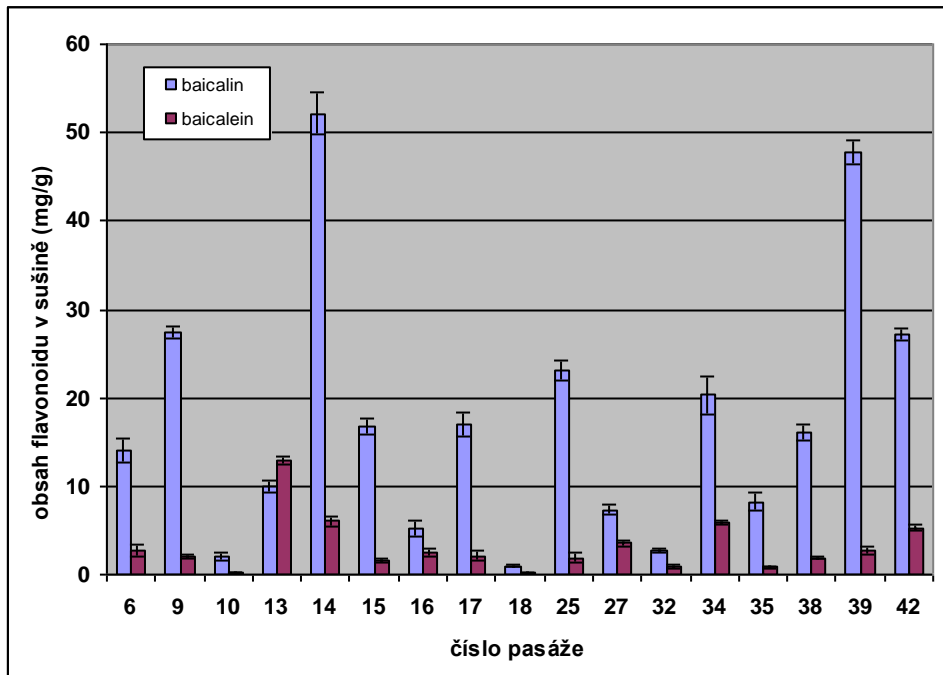
Obsah baicalinu a baicaleinu se v jednotlivých pasážích kalusových kultur výrazně lišil. Množství baicalinu se pohybovalo v rozmezí od 1,0 mg.g⁻¹ po 52,2 mg.g⁻¹, obsah baicaleinu od 0,1 mg.g⁻¹ do 13,0 mg.g⁻¹. Kromě jediné měřené pasáže byl obsah baicalinu vždy vyšší než obsah baicaleinu. S narůstajícím počtem pasáží se výrazně neměnil ani vzhled kultur ani rychlost jejich růstu. Výkyvy v obsahu obou flavonoidů v jednotlivých pasážích ukazuje obr. č. 8.

Kořenové kultury byly odvozeny z kalusových v průběhu experimentů sledujících vliv fytohormonů, to znamená z 6 až 10 pasáže kalusové kultury. Obsahy obou flavonoidů byly v průměru vždy výrazně nižší než u kalusových kultur a pohybovaly se v rozmezí od 0,2 do 8,6 mg.g⁻¹ pro baicalin a od 0,1 do 0,4 mg.g⁻¹ pro baicalein.

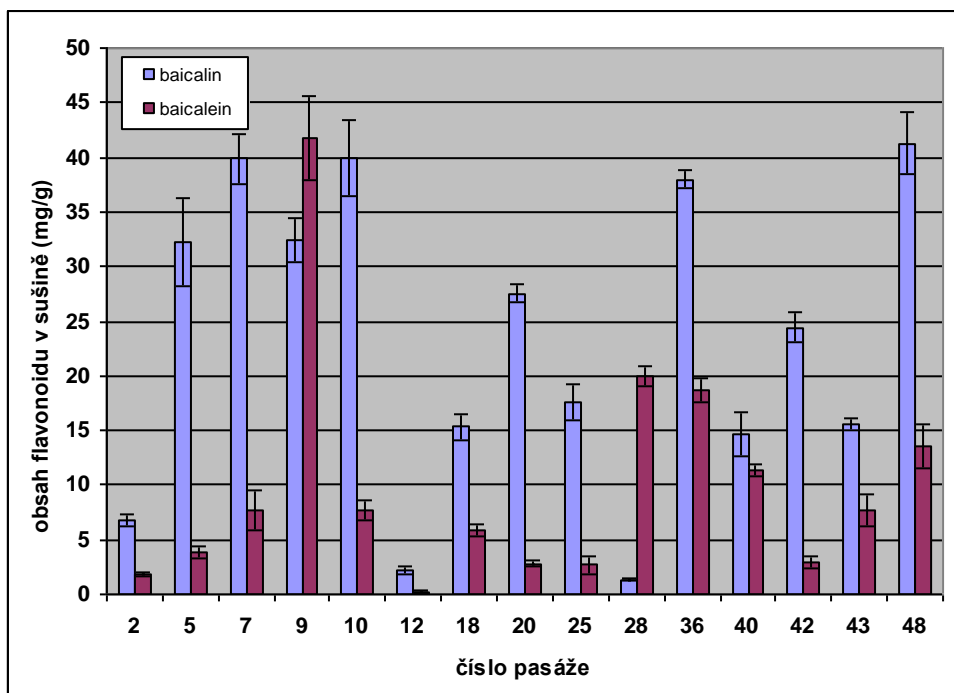
Suspenní kultury byly odvozeny z deváté pasáže kalusové kultury a i u nich byl v jednotlivých pasážích obsah flavonoidů velmi proměnlivý. Baicalin byl v kulturách obsažen v rozsahu od 1,3 do

41,3 mg.g⁻¹ a baicalein od 0,3 do 41,7 mg.g⁻¹. Obsah sledovaných flavonoidů v suspenzních kulturách ukazuje obr. č. 9.

Obr. 8: Obsahy baicalinu a baicaleinu ve sledovaných pasážích kalusových kultur šišáku bajkalského.



Obr. 9: Obsahy baicalinu a baicaleinu ve sledovaných pasážích suspenzních kultur šišáku bajkalského.



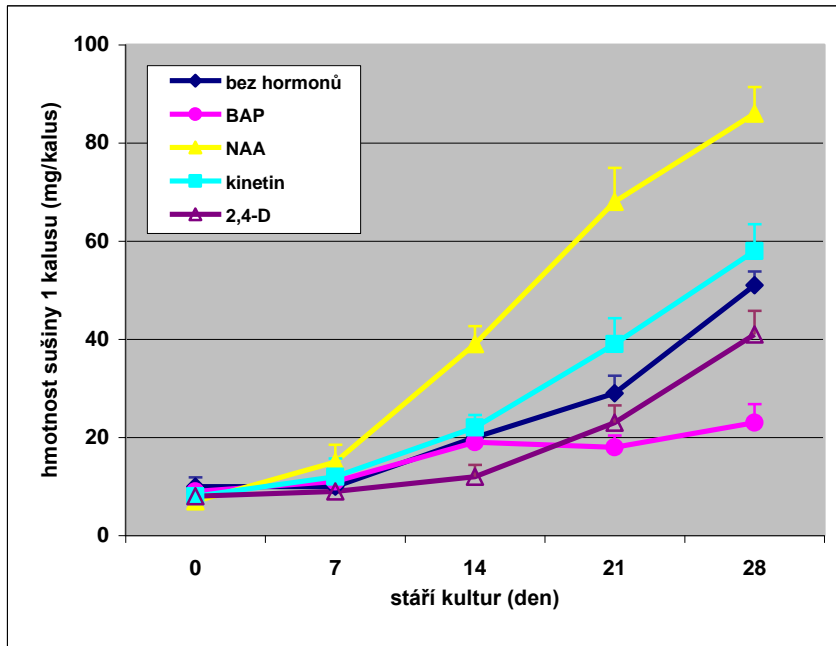
5. 2. Sledování vlivu fytohormonů na kultury *S. baicalensis*

Tato část práce byla zaměřena na sledování vlivu rostlinných hormonů na explantátové kultury šišáku bajkalského. Kalusové kultury šišáku bajkalského byly kultivovány na MS mediích s obsahem kinetinu (v koncentraci $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), BAP ($c = 2 \text{ mg.l}^{-1}$), NAA ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$), 2,4-D ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$). Ostatní kultivační podmínky (intenzita světla, teplota, světelná perioda) byly shodné. V průběhu kultivace bylo sledováno množství sušiny a množství flavonoidů baicaleinu a baicalinu.

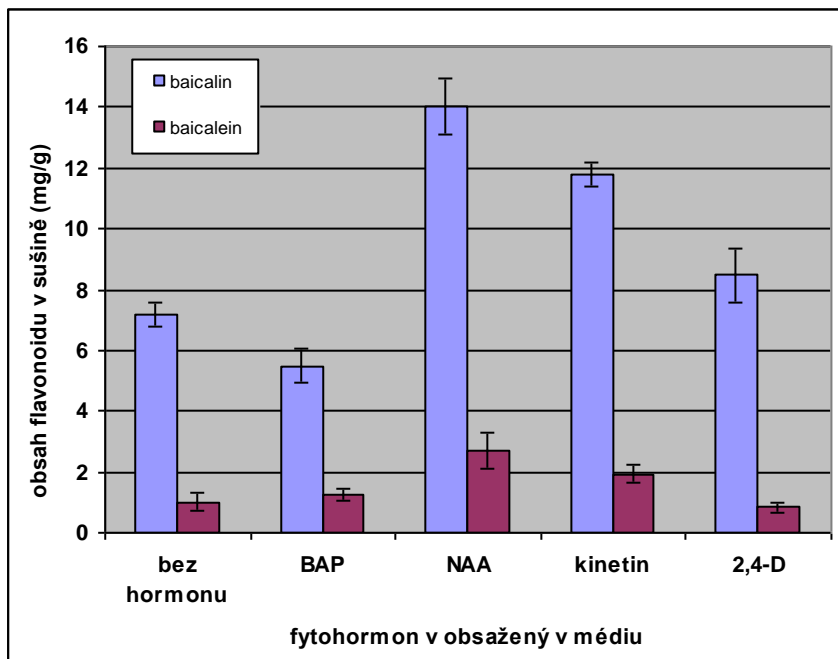
Bylo zjištěno, že nevyšší přírůstek suché hmotnosti kalusů byl u média obohaceného NAA (10 mg.l^{-1}). U tohoto fytohormonu se neprojevila výraznější diferenciaci, kultury byly homogenní, intenzivně zelené díky produkci chlorofylu. U kultur pěstovaných na kinetinu a BAP došlo k mírné diferenciaci, a to konkrétně k vývoji kořenů (u BAP pouze v náznaku). U těchto fytohormonů došlo též ke snížení produkce chlorofylu. U 2,4-D a kontrolních kultur bez fytohormonu byl ve srovnání s NAA pomalejší růst. Množství baicalinu a baicaleinu bylo nejvyšší u NAA a kinetinu. Výsledky jsou shrnuty v grafech (obr. č. 10 a 11).

Množství sledovaných flavonoidů v médiu bylo u všech vzorků pod hranicí stanovitelnosti (menší než kvantitativní limit $0,001 \text{ mg.ml}^{-1}$). Pouze u starých kultur (délka kultivace větší než 32 dní) vykazujících známky vyčerpání živin a následného rozkladu (hnědnutí kalusů) byly flavonoidy obsaženy i v médiu. Baicalin a baicalein tedy zřejmě nejsou živými buňkami do média vylučovány.

Obr. 10: Růstové křivky kalusových kultur *Scutellaria baicalensis* rostoucí na médiích s různým obsahem fytohormonů.



Obr. 11: Obsah sledovaných flavonoidů na konci kultivační periody u kalusových kultur *S. baicalensis* rostoucích na médiích s různým obsahem fytohormonů.



Vzhledem k těmto výsledkům byla v následujících pasážích jako fytohormon použita NAA v koncentraci 10 mg.l^{-1} . Kinetin v koncentraci 1 mg.l^{-1} byl použit k odvození kořenových kultur (viz kapitola 4.1.4.).

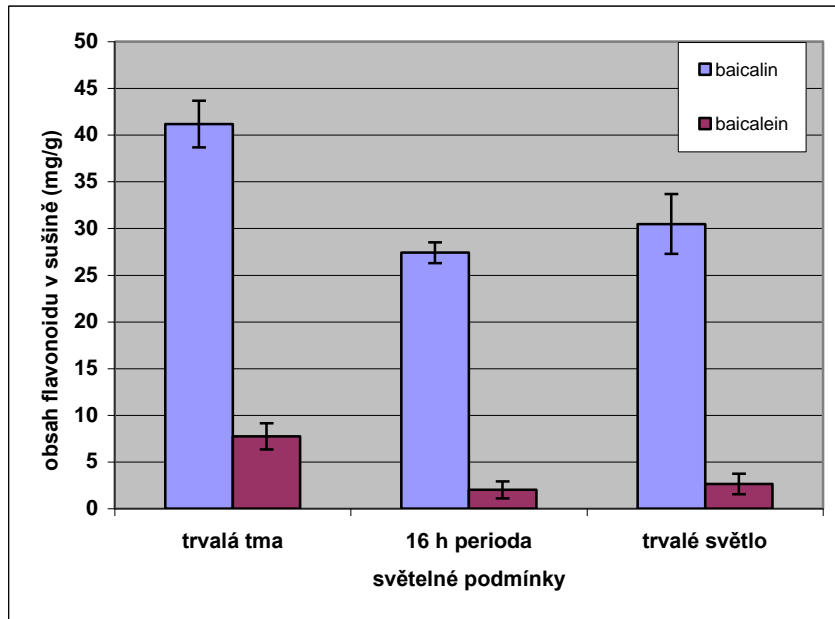
Vliv rostlinných hormonů na růst a diferenciaci explantátových kultur jiných rostlin je poměrně dobře znám. Jako příklad lze uvést práci Jimenéze¹³¹⁾ nebo přehledový článek Sugiyamy.¹³²⁾ Naše studie není tak podrobná a má charakter spíše orientační, protože výsledky měly sloužit zejména pro další kultivace *Scutellaria baicalensis*. Cílem bylo rychle optimalizovat médium pro co nejrychlejší a z hlediska obsahu flavonoidů optimální kultivace, takže byly vyzkoušeny jen nejběžnější fytohormony a jejich nejpoužívanější koncentrace. Pro úplné a přesné zjištění vlivu fytohormonů by bylo třeba vyzkoušet také další koncentrace, další fytohormony a jejich různé kombinace.

5. 3. Sledování vlivu délky osvětlení na kultury *S. baicalensis*

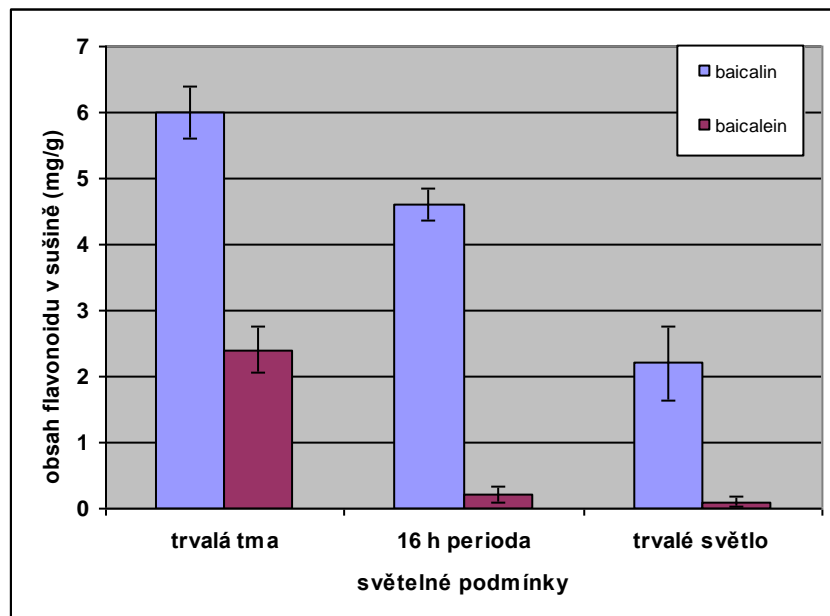
K zjištění vlivu délky osvětlení na explantátové kultury šišáku bajkalského byly tyto kultury pěstovány ve třech různých světelných podmínkách. Jedna část v trvalé, 24 hodinové tmě, druhá v trvalém světle a třetí část kultur při 16 hodinové světelné periodě. Výsledky shrnuté v grafu (obr. č. 12 a 13) ukazují, že délka osvětlení měla významný vliv na růst kultur a obsah flavonoidů.

Kalusové i kořenové kultury kultivované v trvalé tmě produkovaly nejvíce baicalinu i baicaleinu, avšak jejich růst byl ve srovnání s 16 hodinovou periodou pomalejší (obr. č. 14 a 15). Zejména u kalusových kultur došlo v trvalé tmě k výraznému zpomalení růstu – asi o 20%.

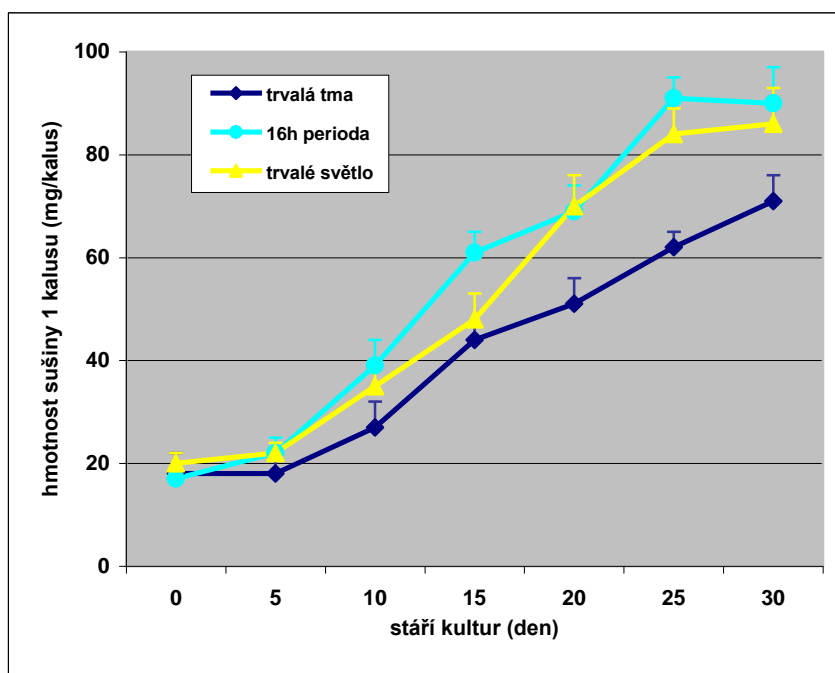
Obr. 12: Vliv délky osvětlení na obsah flavonoidů v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



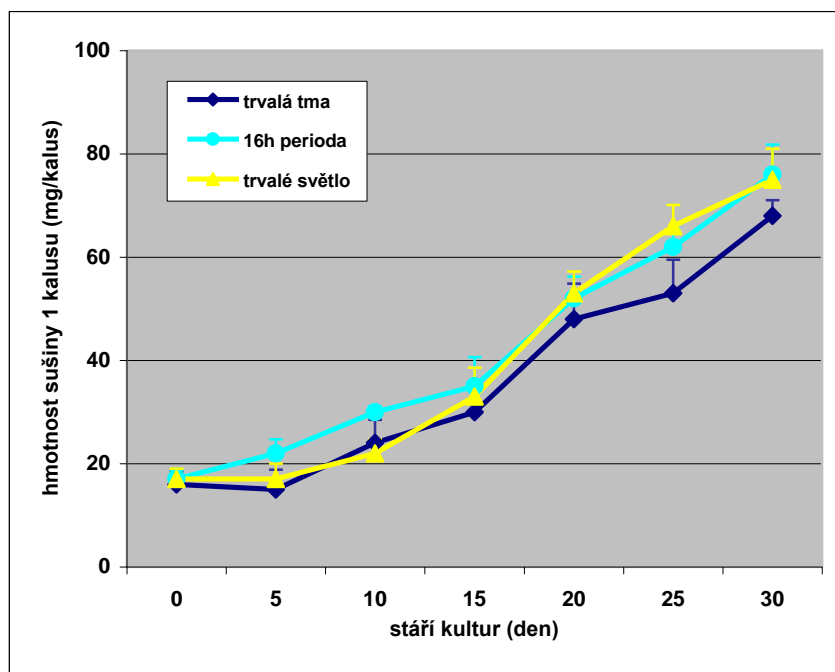
Obr. 13: Vliv délky osvětlení na obsah flavonoidů v kořenové kultuře *S. baicalensis*.



Obr. 14: Růstové křivky kalusových kultur *S. baicalensis* rostoucích v různých světelných podmínkách.



Obr. 15: Růstové křivky kořenových kultur *S. baicalensis* rostoucích v různých světelných podmínkách.



Trvalé celodenní osvětlení způsobilo u kořenových kultur snížení obsahu baicalinu, zatímco u kalusových kultur nemělo významný vliv.

Stejně jako u testování vlivu fytohormonů, ani zde nedocházelo k uvolňování flavonoidů do média (množství menší než kvantitativní limit $0,001 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Tyto výsledky potvrzují, že trvalé světlo obvykle snižuje množství flavonoidů v orgánech, které nejsou za běžných podmínek světlu vystavené (kořeny).¹³³⁾ U některých druhů rodu *Scutellaria* byl již dříve měřen vliv světla na množství flavonoidů v explantátových kulturách.¹³⁴⁾ Ve studii se ukázalo, že trvalá tma mírně zvyšuje obsah flavonoidů. Druh *Scutellaria baicalensis* nebyl zahrnut mezi testované druhy, a proto jsou naše výsledky mimo jiné i doplněním výše zmíněné studie o druh *S. baicalensis*.

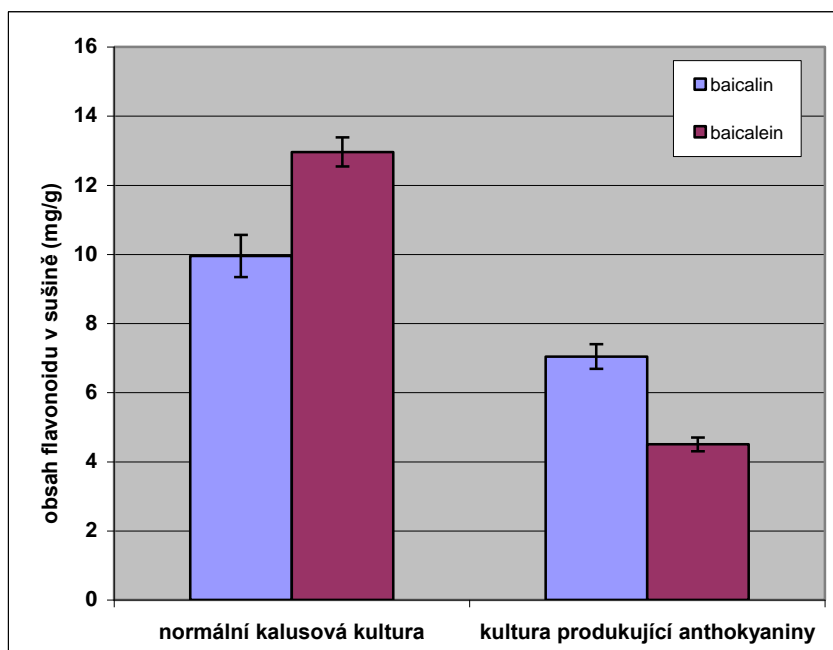
Kořenové kultury pěstované za různých světelných podmínek se od sebe mikroskopicky ani makroskopicky nelišily.

Naproti tomu u kalusových kultur došlo ke změnám ve vzhledu kultur. Ke konci kultivační periody se u skupiny pod trvalým osvětlením objevila produkce anthokyaninových barviv, projevující se fialovým zbarvením. Zřejmě došlo k aktivaci genů odpovídajících za syntézu těchto barviv v květech původní rostliny. Mikroskopickým pozorováním kalusových kultur bylo zjištěno, že ne všechny buňky produkují anthokyaniny, nýbrž vedle sebe koexistují buňky s pigmenty a bez pigmentu. Pigmentované buňky se ve větším množství vyskytovaly zejména na povrchu kalusu, takže spouštěcím signálem pro biosyntézu anthokyaninů je právě světlo. Produkce anthokyaninů nebyla patrná u kalusů kultivovaných ve tmě ani při 16 h světelné periodě. Podobná indukce biosyntézy anthokyaninů světlem už byla v literatuře popsána, například u explantátových kultur druhů *Vitis vinifera*¹³⁵⁾, *Catharanthus roseus*¹³⁶⁾, nebo *Perilla frutescens*¹³⁷⁾.

Několikanásobnou selekcí povrchových částí kalusů, které obsahovaly velké množství pigmentovaných buněk a jejich umístěním v trvalém světle byla po několika pasážích získána kalusová kultura s velkým obsahem anthokyaninů projevující se temně fialovým zbarvením celých kalusů. U této kultury byl stanoven obsah baicalinu a baicaleinu a porovnán s normální neselektovanou kalusovou kulturou *S. baicalensis* rostoucí v 16h světelné periodě. Vzhledem k vysoké produkci anthokyaninů byl předpoklad, že bude díky sdílení metabolických cest ovlivněn i obsah flavonoidů.^{138, 139)}

Z výsledků (obr. č. 16), je zřejmé, že došlo k výraznému snížení produkce baicalinu i baicaleinu u kultur produkující anthokyaniny, a to zřejmě v důsledku zvýšené přeměny flavonoidů na anthokyaninová barviva.

Obr. 16: Obsah baicalinu a baicaleinu u normální kalusové kultury a u kultury produkující anthokyaniny.



Trvalé osvětlení pravděpodobně působilo na buňky stresově, a jako odpověď došlo k expresi genů kódujících chalkonsyntasu, chalkonisomerasu a hlavně dihydroflavonol-4-reduktasu, což je první enzym vedoucí k syntéze anthokyaninů. V důsledku toho se v buňkách na úkor obsahu flavonoidů akumulovaly anthokyaniny, podobně jak je popsáno v literatuře u kultury *Vitis vinifera*.¹³⁵⁾

5. 4. Sledování vlivu potenciálních prekurzorů

Bylo vyzkoušeno pět potenciálních prekurzorů k zvýšení obsahu baicalinu a baicaleinu: fenylalanin, kyselina skořicová, skořican sodný, kyselina malonová a malonan sodný (viz kapitola 4. 3.). Výsledný efekt jednotlivých prekurzorů je patrný z grafů (obr. č. 17 až 26).

K signifikantnímu zvýšení obsahu obou sledovaných flavonoidů došlo zejména při přidání skořicanu sodného (obr. č. 17 a 18). Po 20 hodinách sice nedošlo u kalusových kultur k výraznějším změnám v produkci flavonoidů, ale v časovém intervalu 40 hodin došlo u všech koncentrací prekurzoru k navýšení obsahu baicalinu, a to na minimálně dvojnásobek ve srovnání s kontrolou.

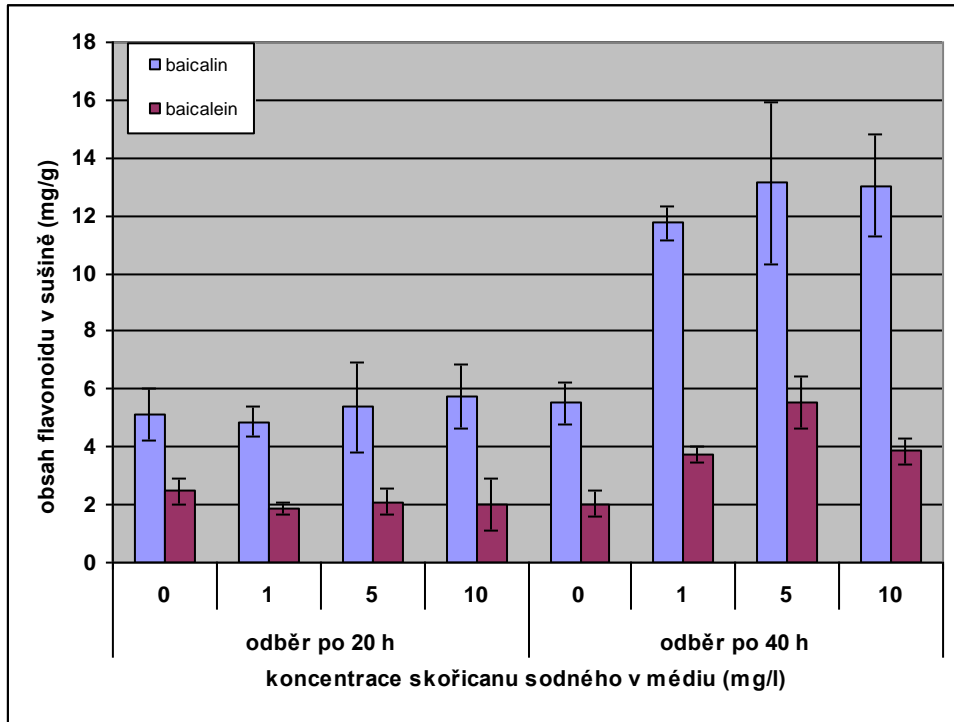
U suspenzních kultur bylo podobné zvýšení zaznamenáno už po dvaceti hodinách. Zároveň byl u nejvyšší koncentrace skořicanu sodného zaznamenán toxický efekt, který se projevil hnědnutím kultur a uvolňováním baicalinu a baicaleinu do média, ve kterém nejsou tyto látky normálně přítomny. U této koncentrace došlo k výrazné inhibici růstu kultur. Z tohoto důvodu je optimální koncentrace CINNa v médiu 5 mg.l⁻¹.

Grafy na obrázku č. 19 a 20 ukazují vliv kyseliny skořicové na produkci baicalinu a baicaleinu u kalusových a suspenzních kultur.

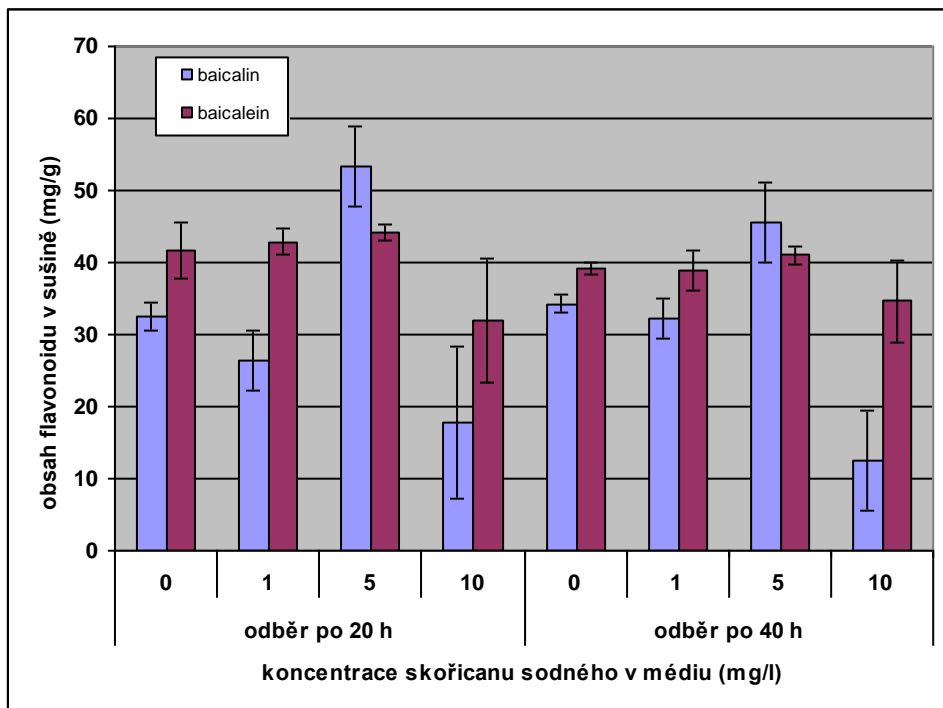
Zvýšení produkce nebylo tak výrazné jako u skořičanu sodného a bylo zaznamenáno jen u suspenzních kultur v koncentraci 1 mg.l^{-1} . Koncentrace 10 mg.l^{-1} kyseliny skořicové působila taktéž toxicky.

Přidávání fenylalaninu (obr. 21 a 22), kyseliny malonové (obr. 23 a 24) a malonanu sodného (obr. 25 a 26) nevedlo k pozitivním výsledkům. Zmíněné látky buďto neměly žádný vliv, nebo mírně snižovaly množství sledovaných flavonoidů v kulturách.

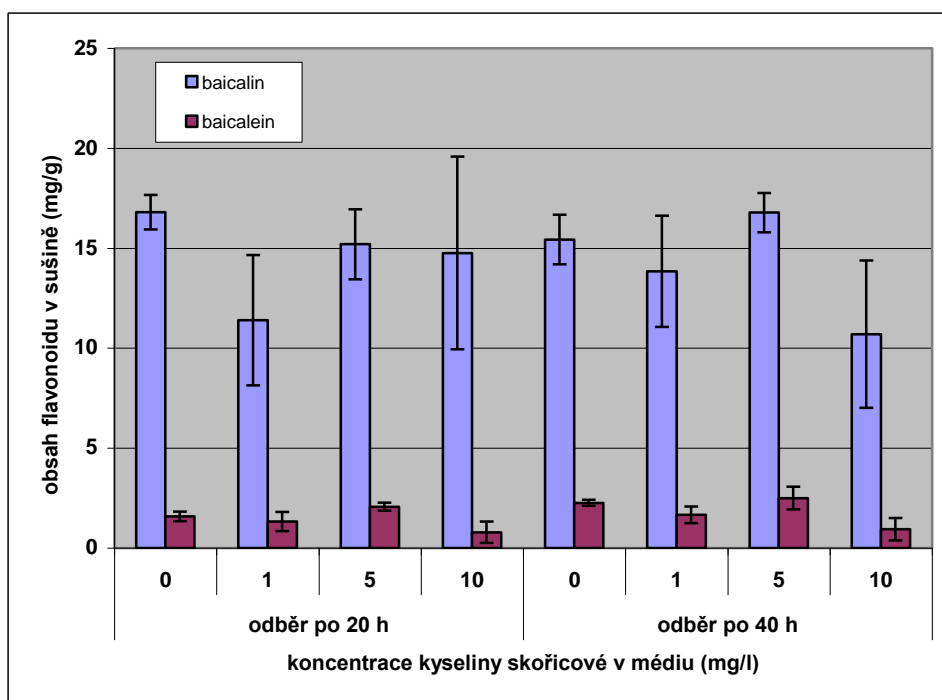
Obr. 17: Vliv skořičanu sodného na obsah baicalinu a baicaleinu v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



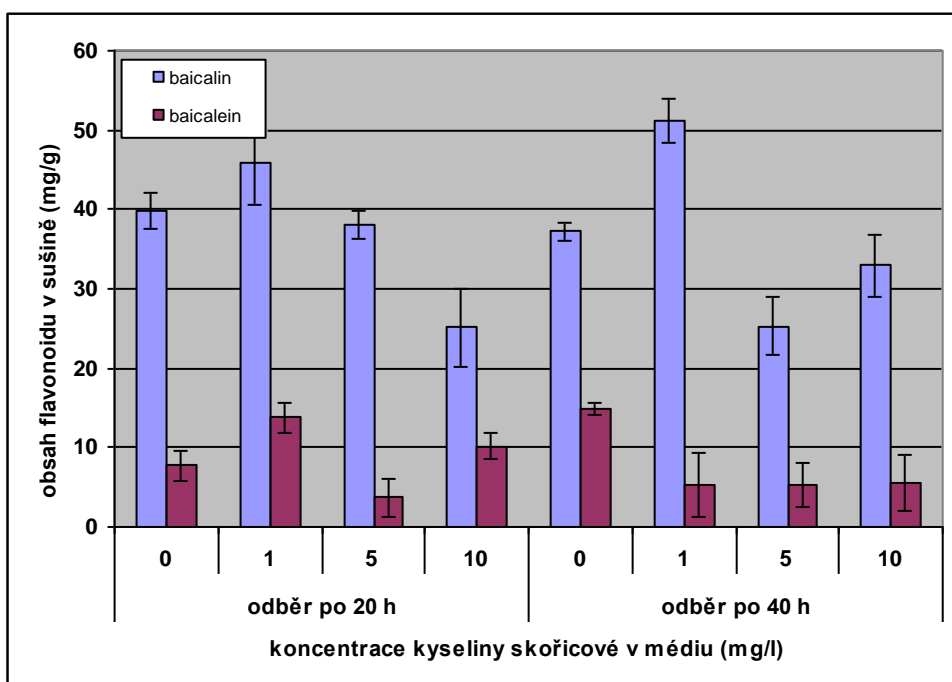
Obr. 18: Vliv skořičanu sodného na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře *S. baicalensis*.



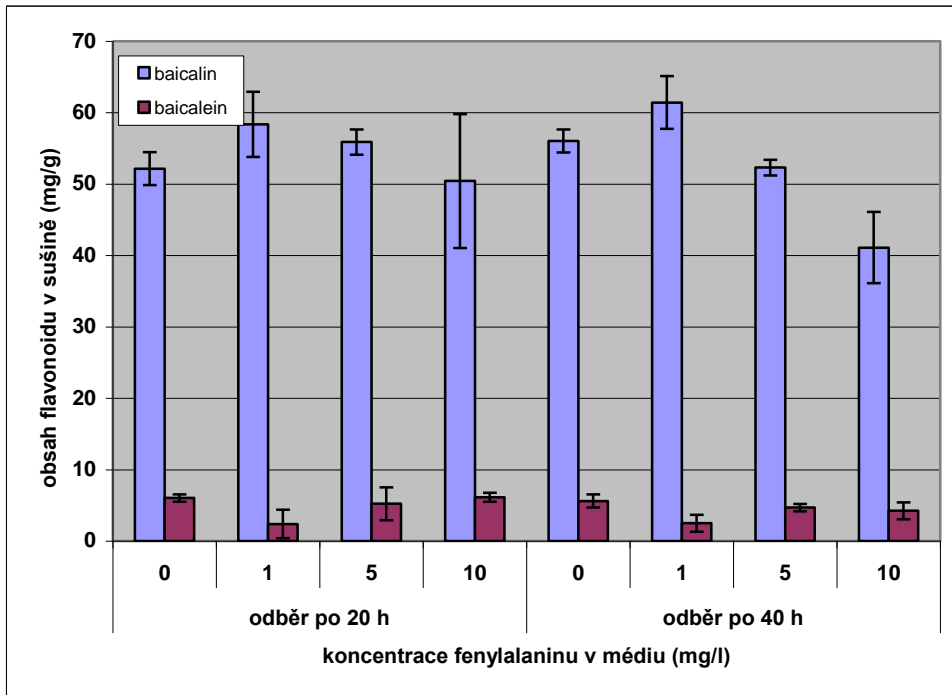
Obr. 19: Vliv kyseliny skořicové na obsah baicalinu a baicaleinu v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



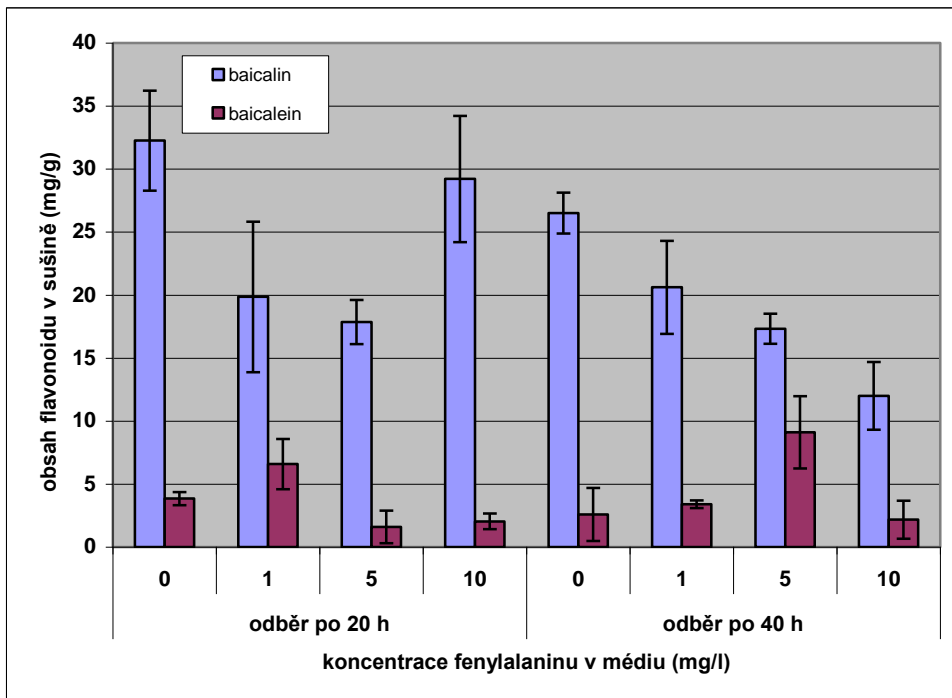
Obr. 20: Vliv kyseliny skořicové na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenní kultuře *S. baicalensis*.



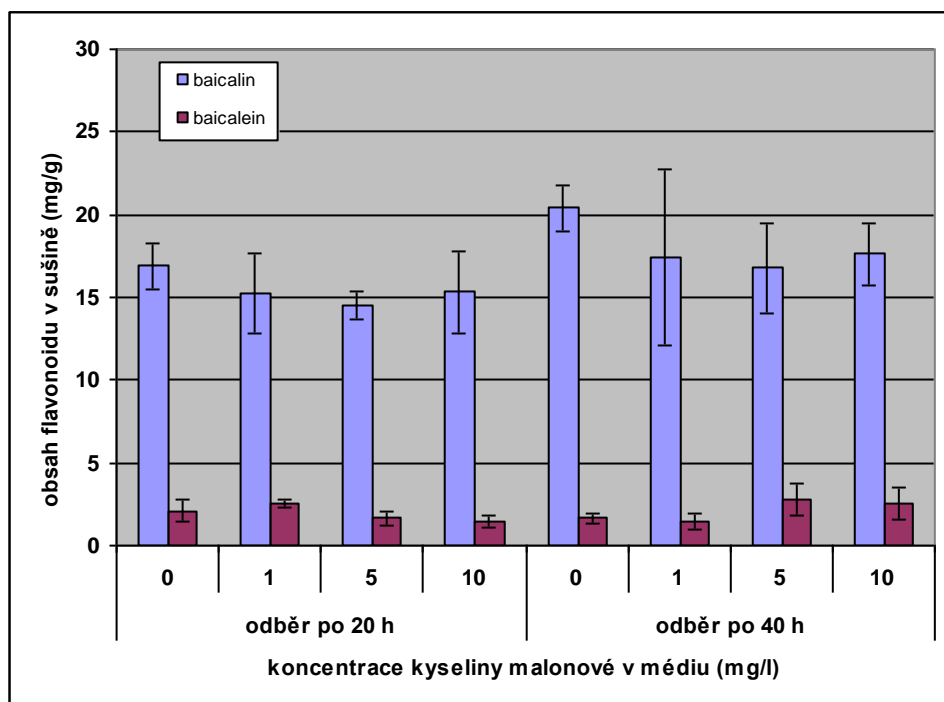
Obr. 21: Vliv fenylalaninu na obsah baicalinu a baicaleinu v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



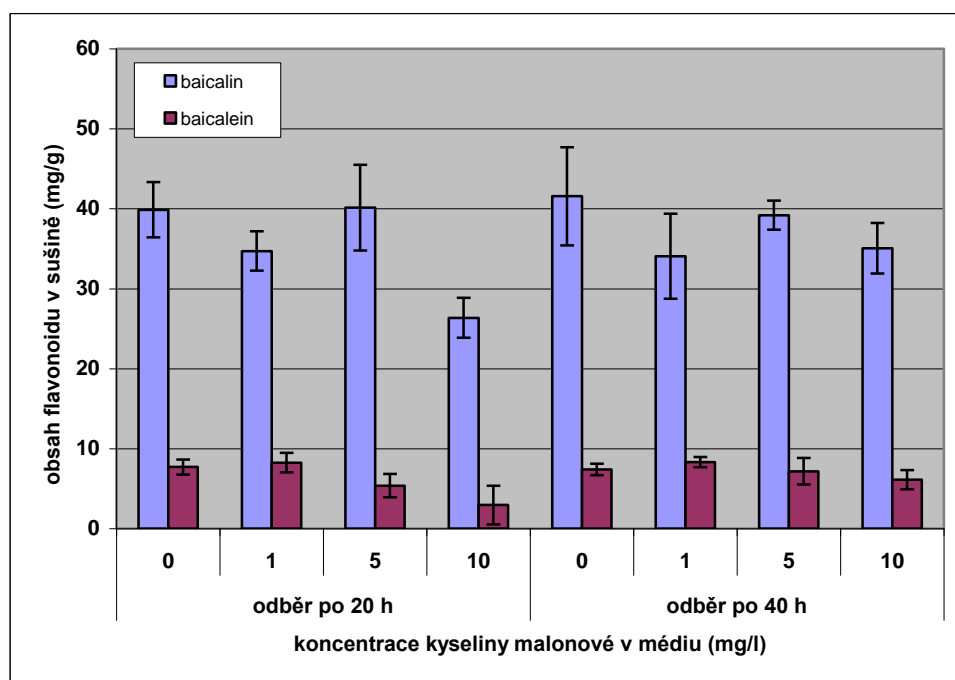
Obr. 22: Vliv fenylalaninu na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenní kultuře *S. baicalensis*.



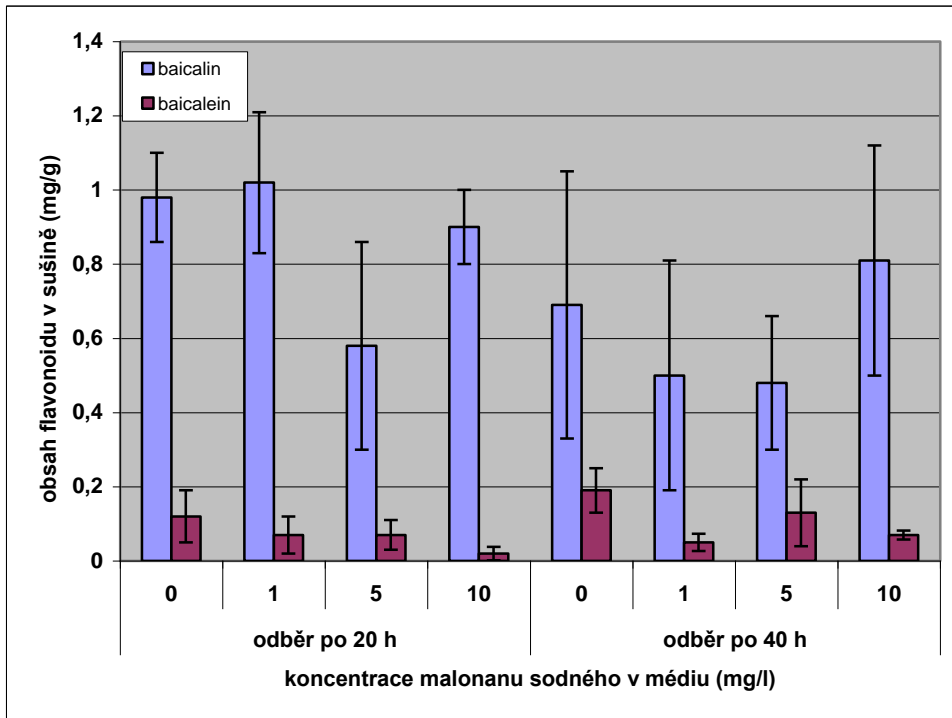
Obr. 23: Vliv kyseliny malonové na obsah baicalinu a baicaleinu v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



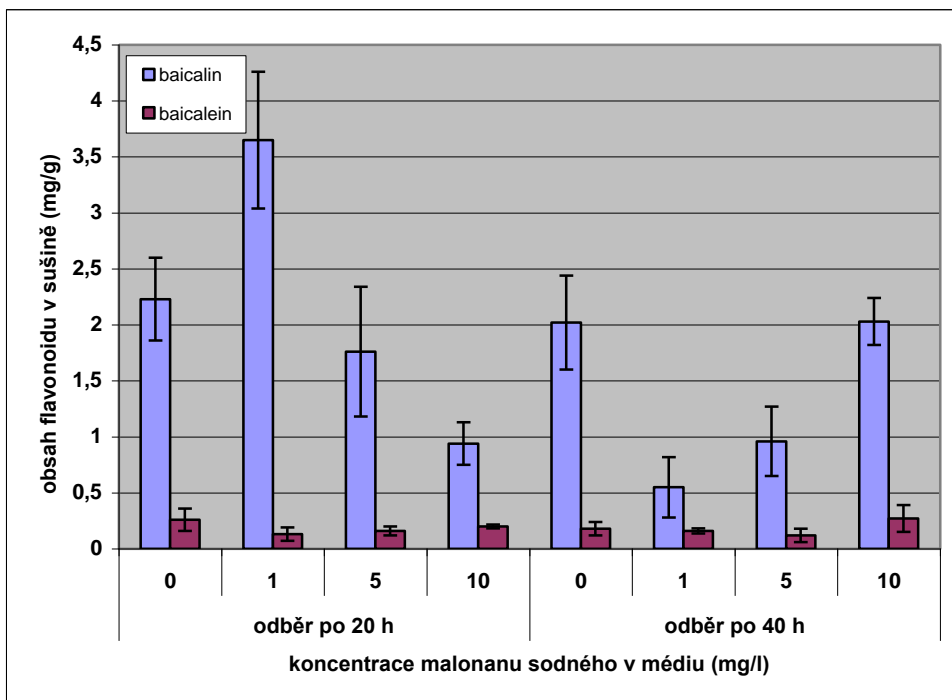
Obr. 24: Vliv kyseliny malonové na obsah baicalinu a baicaleinu v suspensní kultuře *S. baicalensis*.



Obr. 25: Vliv malonanu sodného na obsah baicalinu a baicaleinu v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



Obr. 26: Vliv malonanu sodného na obsah baicalinu a baicaleinu v suspenzní kultuře *S. baicalensis*.



5. 5. Vliv elicítace reaktivními formami kyslíku

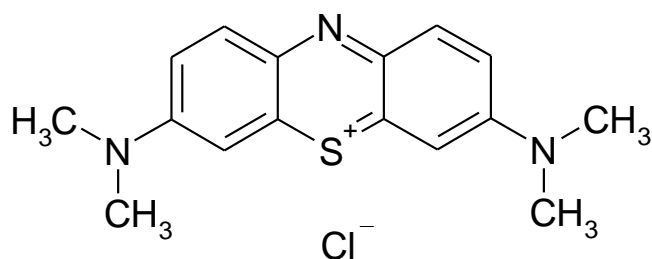
Na kalusových a suspenzních kulturách šiřáku bajkalského byl testován vliv methylenové modři. Výsledky jsou shrnuty v grafech (obr. č. 27 a 28).

Je zřejmé, že množství baicalinu se zvýřilo zejména u suspenzních kultur, a to při odběru po 8 i 24 hodinách. U kalusových kultur dořlo k elicítaci pouze po 24 hodinové kultivaci. To je dáno lepřím kontaktem suspendovaných buněk s živným médiem. Vliv methylenové modři na produkci druhé sledované látky - baicaleinu byl patrný pouze u suspenzních kultur, a to u koncentrace 1 mg.l^{-1} po 8 h elicítaci a 100 mg.l^{-1} po 24 h elicítaci.

Vyšří koncentrace methylenové modři než námi použité, vedou k zvýřenému odumírání buněk a k uvolňování flavonoidů do média. Z tohoto důvodu je koncentrace 100 mg.l^{-1} nejvyšří možná a pro elicítaci explantátových kultur nejvýhodněřší.

Methylenová modř (obr. č. 29) je ve vodě rozpustné barvivo, které se používá k barvení mikroskopických preparátů. Protože neprostupuje přes buněčnou stěnu živých rostlinných buněk, nemůž e elicítovat přímým zásahem do sekundárního metabolismu buňky, ale působí nepřím o jako generátor aktivních forem kyslíku.¹⁴³⁾ V přítomnosti světla a molekulárního kyslíku produkuje tato látka kyslíkový radikál a nepřím o i jiné aktivní formy kyslíku: peroxidy a superoxidy. Tyto aktivní formy kyslíku ohrožují buňky mimo jiné tím, že způsobují poškození DNA.^{141, 142)}

Obr. 29: Struktura methylenové modři



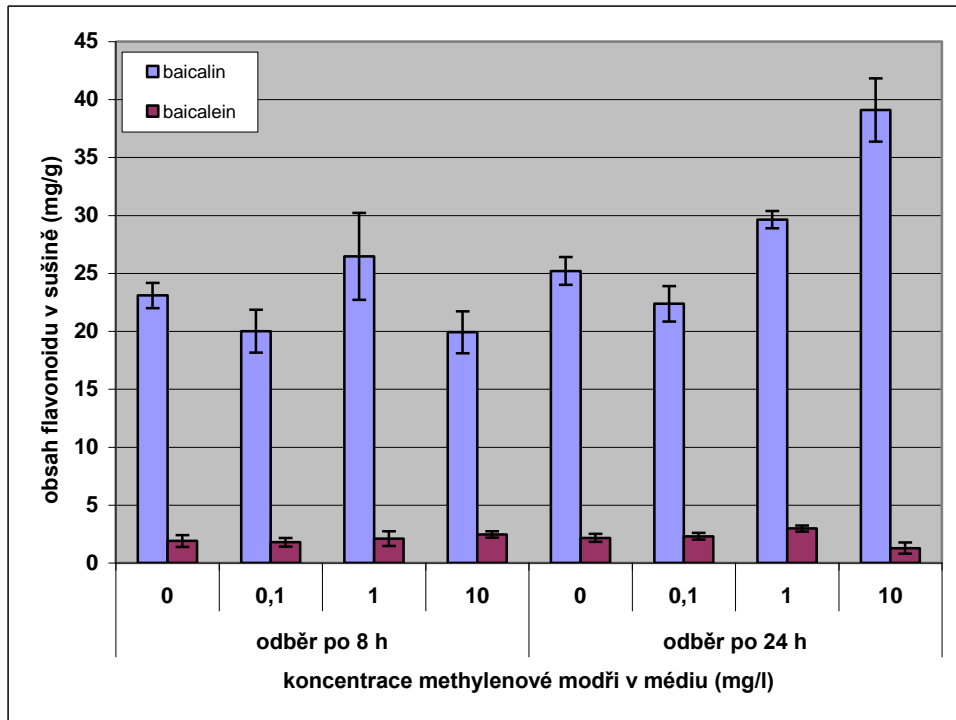
Přidání methylenové modři do živného média tedy pravděpodobně spouští obrannou reakci buňky a zvyšuje obsah látek, které jsou schopny vylučovat volné radikály. Narozdíl od přidání peroxidu vodíku je produkce aktivních forem kyslíku sice malá, ale kontinuální. To vede k tomu, že se nashromáždí syntéza baicalinu jakožto transportní a zásobní formy antioxidantně působícího baicaleinu. Baicalein je průběžně uvolňován z baicalinu a oxidován na 6,7-dehydrobaicalein. Proto se obsah baicaleinu výrazně nezvyšuje.

Pro srovnání byl jako elicitator použit i peroxid vodíku. Princip působení je podobný (aktivní forma kyslíku), ale po jeho přidání dojde k velkému nárazovému zvýšení množství H_2O_2 v médiu, které se pomocí detoxikačních systémů buňky s postupem času snižuje.

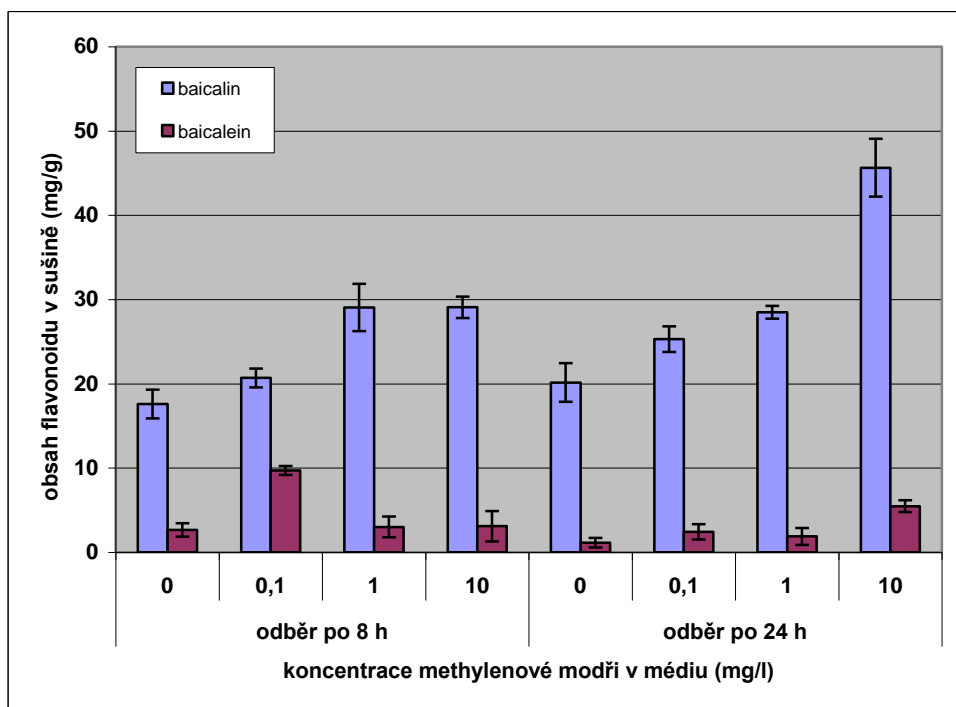
Výsledky elicitační peroxidem vodíku ukazují obrázky č. 30 a 31. Je zřejmé, že po 8 i 24 hodinách od přidání H_2O_2 došlo k velkému snížení obsahu baicaleinu. Množství baicalinu se výrazně nezměnilo (8h), nebo bylo jen mírně zvýšeno (24h).

Rapidní snížení obsahu baicaleinu lze vysvětlit jeho rychlou oxidací na 6,7-dehydrobaicalein. Uvolňování baicaleinu z baicalinu probíhá konstantní rychlostí a nestačí zvýšeným potřebám buňky.

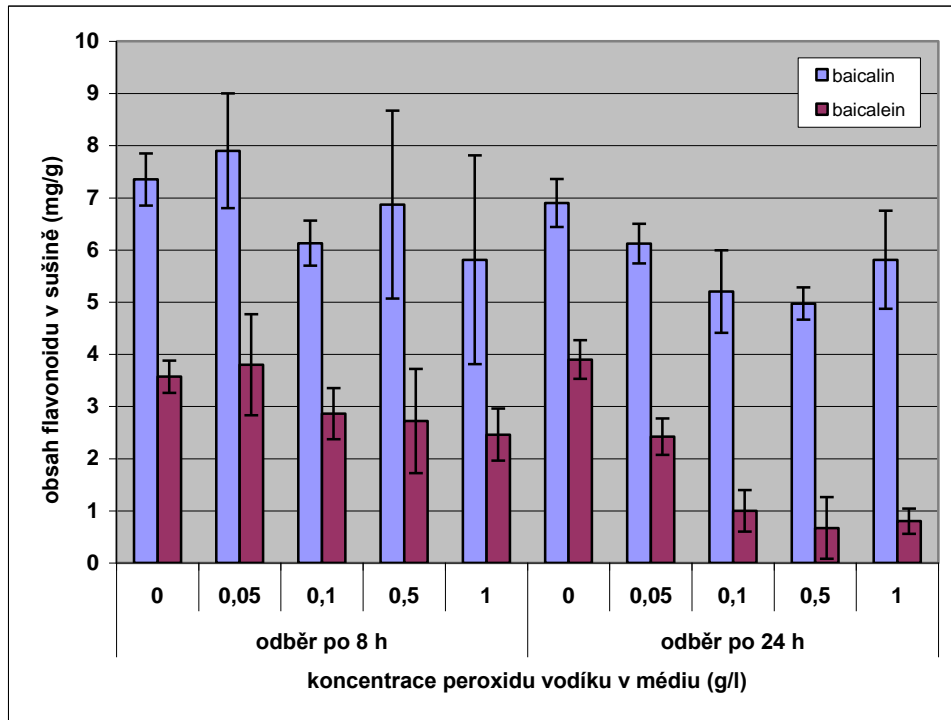
Obr. 27: Obsah baicalinu a baicaleinu po elicitaci methylenovou modří v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



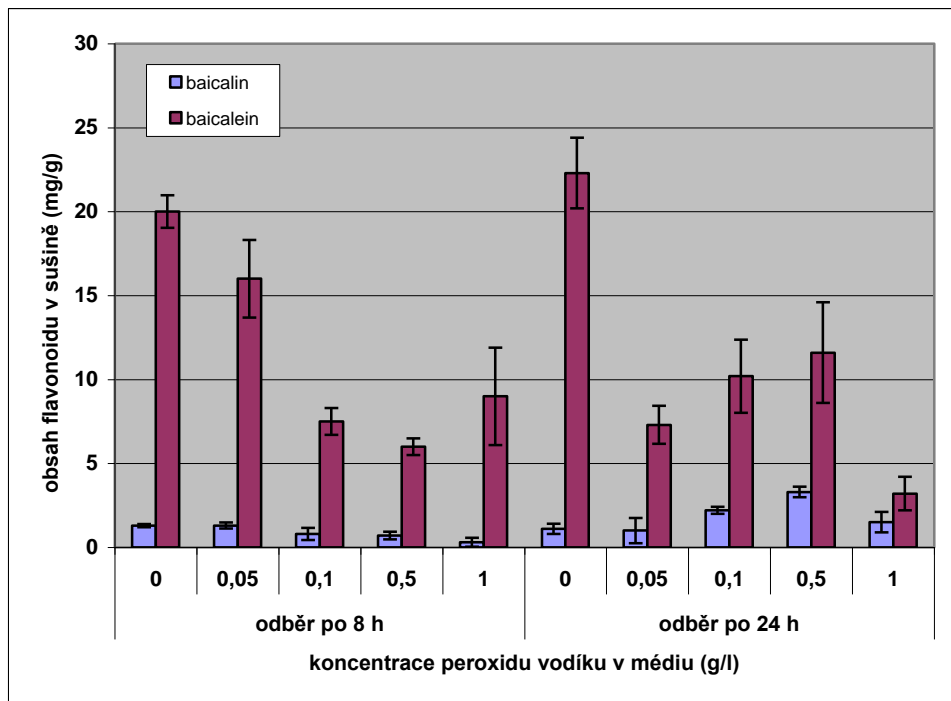
Obr. 28: Obsah baicalinu a baicaleinu po elicitaci methylenovou modří v suspenzní kultuře *S. baicalensis*.



Obr. 30: Obsah baicalinu a baicaleinu po elicitaci peroxidem vodíku v kalusové kultuře *S. baicalensis*.



Obr. 31: Obsah baicalinu a baicaleinu po elicitaci peroxidem vodíku v suspenzní kultuře *S. baicalensis*.



5. 6. Sledování vlivu měďnatých iontů

Na kalusových a suspenzních kulturách byl sledován vliv octanu měďnatého na produkci flavonoidů. Jak ukazují grafy (obr. č. 32 a 33), v obsahu baicalinu došlo jen k nevýznamným změnám. Množství baicaleinu bylo u vyšších koncentrací octanu měďnatého (10 a 100 mg.l⁻¹) nižší než u kontrolních kultur.

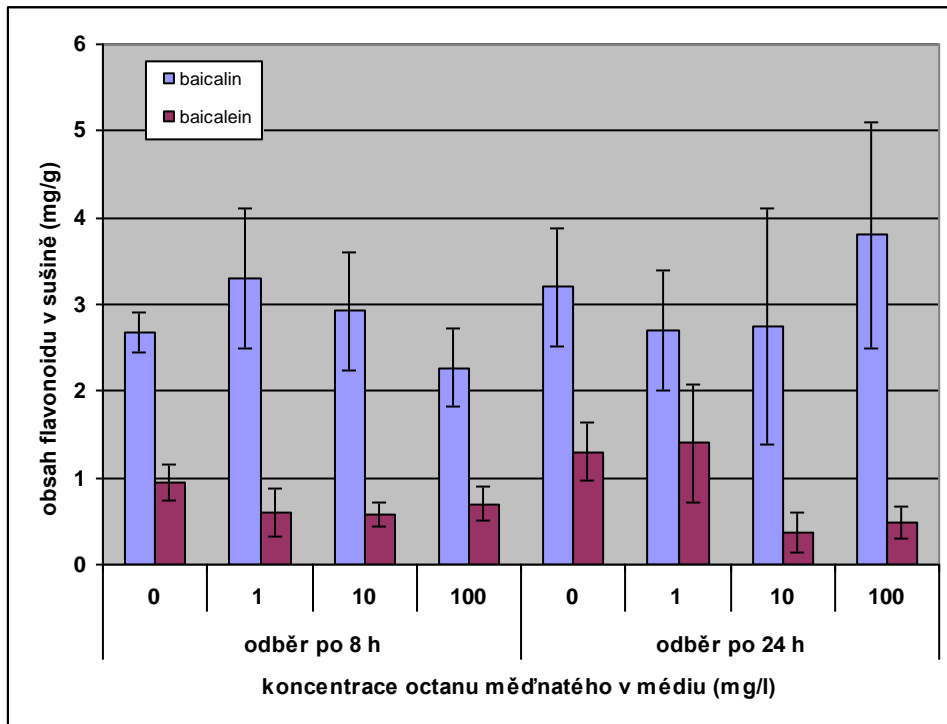
Měďnaté ionty jsou pro buňky důležité nejen jako koenzymy při oxidativních fosforylacích a fotosyntéze, ale hrají roli i při detoxikaci kyslíkových radikálů.¹⁴⁵⁾ Ve vyšších koncentracích naopak způsobují oxidační stres a působí na buňku toxicky.

Přidání měďnatých iontů způsobuje zvýšení aktivity některých enzymů (askorbát-peroxidázy, katalázy), naopak inhibována je glutathionreduktáza.¹⁴⁶⁾ Měďnaté ionty také zvyšují množství jasmonátů a metyljasmonátů.¹⁴⁷⁾

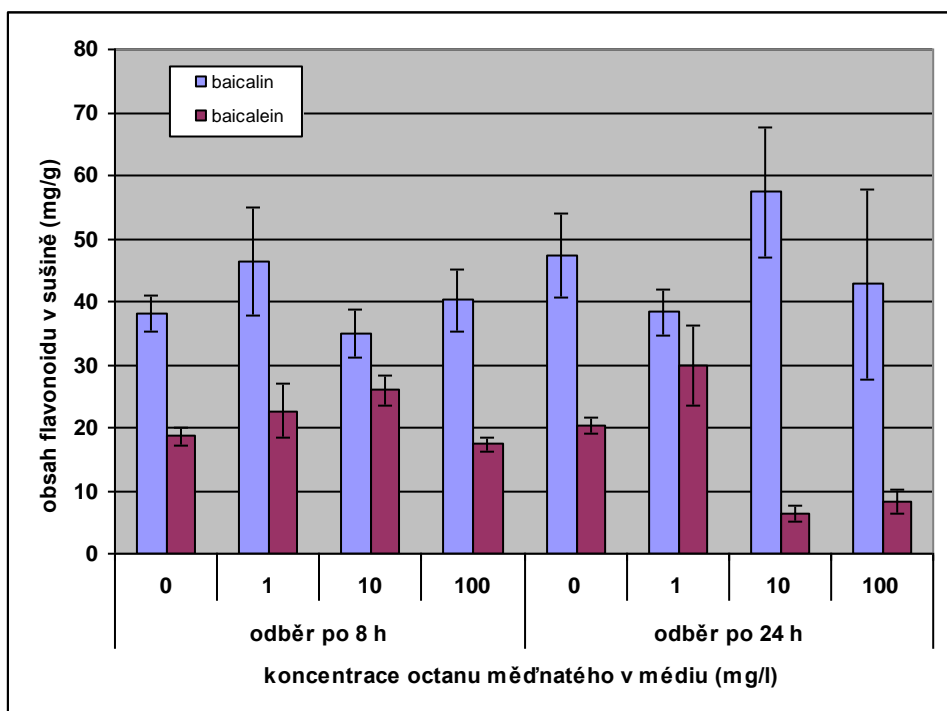
Z literatury je známo hned několik úspěšných použití měďnatých iontů ke zvýšení obsahu sekundárních metabolitů. Například u druhu *Pueraria lobata* došlo nejen k nárůstu obsahu isoflavonoidů, ale i k syntéze nových isoflavonoidních struktur, které se u kontrolních vzorků nevyskytovaly.¹⁴⁴⁾

Při sledování vlivu měďnatých iontů na kalusové a suspenzní kultury šiřáku bajkalského nedošlo k nárůstu množství flavonoidů.

Obr. 32: Vliv octanu měďnatého na kalusové kultury *S. baicalensis*.



Obr. 33: Vliv octanu měďnatého na suspenní kultury *S. baicalensis*.



5. 7. Kultivace suspenzní kultury v laboratorním bioreaktoru

Vzhledem k tomu, že k dispozici byl bioreaktor s jednou kultivační nádobou, a tedy s nemožností provádět paralelní kontrolní kultivaci, byla při každé další pasáži provedena jen jediná změna a ta byla porovnána s předchozí pasáží. Hodnoceno bylo množství biomasy, vyjádřené jako hmotnost usušených buněk vztažená na 1 litr média. Množství baicaleinu a baicalinu v jednotlivých pasážích výrazně kolísalo i beze změny kultivačních podmínek a proto jeho porovnávání nemělo smysl.

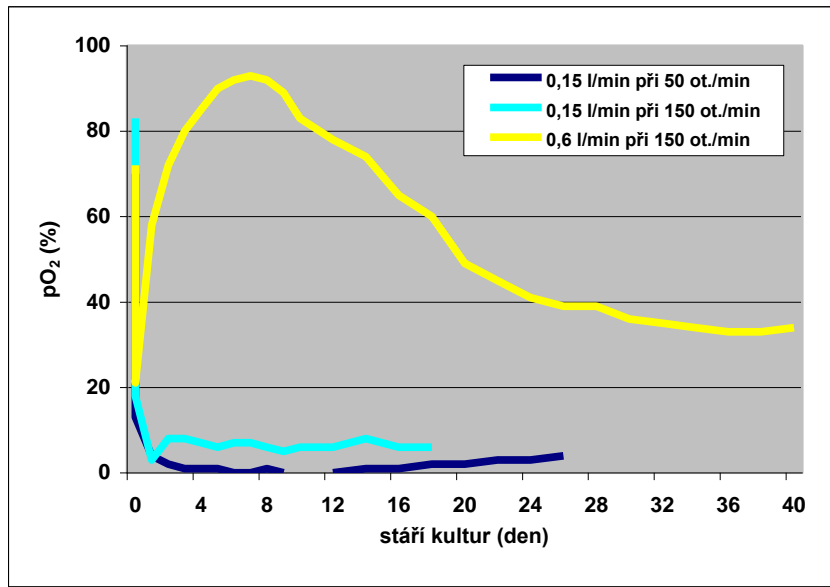
Teplota: 25°C; hodnota této kultivační podmínky byla odvozena od kultivací suspenzních kultur šišáku bajkalského v baňkách a v průběhu experimentů se ukázala jako vyhovující.

Rychlost míchání: vzhledem k odlišnému způsobu míchání a možnosti většího poškození buněk lopatkovým míchadlem, byla nejdříve zvolena frekvence míchání na 50 otáček za minutu (při nižší rychlosti by docházelo k sedimentaci buněk). Později se prokázalo, že buňky snesou i vyšší rychlost míchání: optimální rychlost je 120 až 150 ot.min⁻¹.

Vzdušnění: vzdušnění je bráno jako množství vzduchu dodaného do kultivační nádoby za jednotku času. Je sledováno nepřímo pomocí kyslíkové sondy měřící pO₂. Úzce souvisí i s rychlostí míchání. U první kultivace bylo nastaveno na 0,15 l.min⁻¹ (při 50 ot.min⁻¹), což se ukázalo jako nedostatečné (viz obr. č. 34). Zvýšením rychlosti míchání na 150 ot.min⁻¹ došlo jen k malému zlepšení, a proto bylo vzdušnění postupně zvýšeno až na 0,8 l.min⁻¹. Při těchto hodnotách ovšem zase dochází k vynášení rostlinných buněk bublinami vzduchu nad hladinu média a

k jejich odumírání. Jako kompromisní řešení bylo nakonec použito vzdušnění $0,6 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$.

Obr. 34: Vliv míchání a vzdušnění na relativní množství kyslíku v kultivační nádobě při kultivaci suspenzních kultur *S. baicalenis*.



pH: při první kultivaci byly hodnoty pH pouze pasivně sledovány. Protože se výrazně nemění a pohybují se v rozmezí pro rostlinné buňky vhodném, nebylo třeba ho upravovat. Při pozdějším pokusu o optimalizaci bylo vyzkoušeno udržovat pH nad hodnotou 5,5. K výraznému zlepšení růstu ale nedošlo.

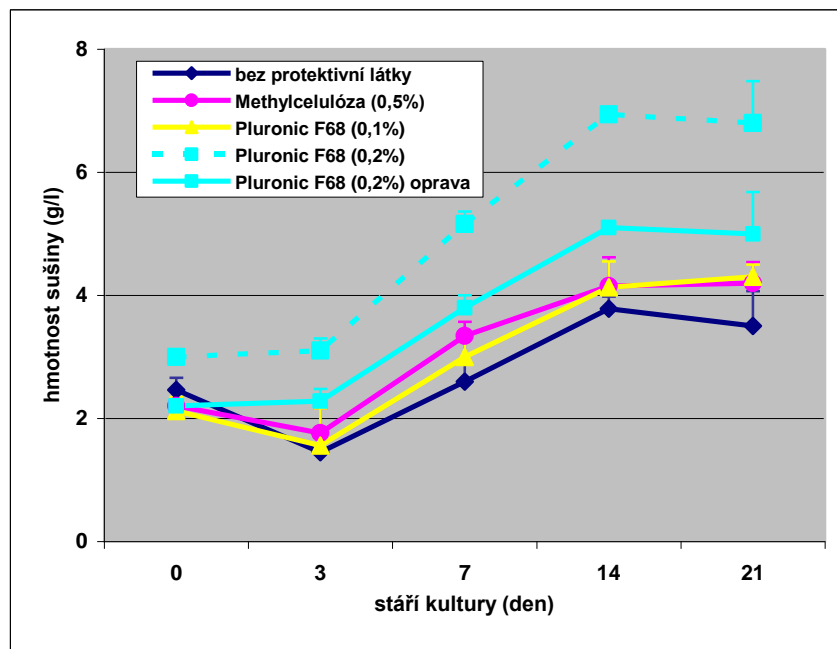
Osvětlení: testováno bylo trvalé osvětlení, trvalá tma a 16 hodinová perioda. Rozdíly v přírůstku biomasy byly nevýznamné.

Protektivní látky: do média byly přidávány látky snižující střížné síly působící na povrch buněk.

Methylcelulóza v koncentraci 0,5% a Pluronic F-68 (0,1%) nevýznamně zrychlili růst kultur. U Pluronicu F-68 v koncentraci 0,2%

došlo malému, ale statisticky významnému zvýšení rychlosti růstu (viz obr. č. 35), a to i po matematické extrapolaci vynucené chybou (výrazně větší množství inokula u pokusu s 0,2 % Pluronicem F68). Pluronic F68 tedy zvyšoval odolnost buněk proti střížným silám, ale zároveň bylo při této kultivaci pozorováno významné snížení pO_2 . Pozitivní efekt Pluronicu F68 na růst kultury by byl zřejmě ještě vyšší při současném zvýšení vzdušnění nebo rychlosti míchání.

Obr. 35: Vliv některých protektivních látek na rychlost růstu suspenzních kultur *S. baicalensis*.



Pozitivní efekt methylcelulózy se nepodařilo potvrdit. Částečně to bylo způsobeno i tím, že methylcelulóza obsažená v médiu podstatně zvyšovala tvorbu pěny a docházelo k usazování rostlinného materiálu v pění nad úrovní hladiny média. I když i tyto buňky přeživaly, odběr vzorků tak byl zatížen chybou a naměřená množství sušiny jsou nižší než odpovídá množství buněčného materiálu v bioreaktoru.

Optimalizace kultivačních podmínek pro kultivaci suspenzních kultur v bioreaktoru není ještě dokončena a bude dále probíhat. Například bude sledován vliv methylcelulózy za současné přítomnosti látek snižujících tvorbu pěny.

Řešen bude i problém s nízkou produkcí biomasy. Ta dosahuje maximálně 7 gramů sušiny na litr média, zatímco u suspenzních kultur pěstovaných v baňkách se pohybuje okolo 10 g.l^{-1} .

6. ZÁVĚR

- z dostupných informačních zdrojů byl vypracován přehled týkající se rostliny *Scutellaria baicalensis* Georgii a biologické aktivity hlavních obsahových látek. Tento přehled byl publikován a jeho podstatná část je součástí teoretické stati této disertační práce.^{150, 151, 152)}
- podařilo se založit kalusovou kulturu *Scutellaria baicalensis* Georgii a z ní odvodit další typy explantátových kultur: kulturu suspenzní a kulturu kořenovou.
- protože se v literatuře nepodařilo najít HPLC metodu úplně vyhovující našim podmínkám a vybavení, byla vypracována vlastní HPLC analytická metoda pro kvantitativní stanovení sledovaných flavonoidů (baicalin, baicalein). Tato metoda vyhovovala všem validačním kritériím zmíněným v kapitole 4. 2. 3.
- při studiu kultivačních podmínek byl nejvyšší obsah obou sledovaných flavonoidů pozorován u MS půdy obsahující 10 mg.l⁻¹ NAA. Na této půdě rostly také kultury nejrychleji. Kultivace v trvalé tmě přinesla sice zvýšení obsahu flavonoidů, ale zároveň zpomalila růst kultur. Vlivem umístění kalusových kultur do trvalého světla byla iniciována biosyntéza anthokyaninů.
- množství baicalinu a baicaleinu v kulturách bylo zvýšeno po přidavku některých potenciálních prekurzorů. Jako nejlepší se ukázal přídatek skořičanu sodného v koncentraci 5 mg.l⁻¹, kdy došlo ke zdvojnásobení produkce baicalinu oproti kontrole.

- při sledování vlivu vybraných elicitorů bylo zjištěno, že množství baicalinu a baicaleinu lze zvýšit přidáním methylenové modři do kultivačního média. Pro obsah baicalinu byla optimální koncentrace methylenové modři 10 mg.l⁻¹ při odběru po 24 hodinách, pro baicalein to byla koncentrace 0,1 mg.l⁻¹ a 8 h odběr.
- při zavádění kultivace suspenzní kultury v laboratorním bioreaktoru se jako klíčová ukázala role rychlosti míchání a rychlosti vzdušnění. Pro růst kultury bylo nezbytné udržovat množství kyslíku rozpuštěného v médiu nad relativní hodnotou pO₂ = 20%. Toho bylo docíleno při rychlosti míchání 150 otáček za minutu a vzdušněním 0,6 l.min⁻¹. Rychlost růstu pak byla pozitivně ovlivněna přidavkem Pluronicu F68 do živného média, a to v koncentraci 2 g.l⁻¹.
- ve spolupráci s katedrou biochemie byl testován vliv baicalinu a baicaleinu na aktivitu aspartat-aminotransferasy. Bylo zjištěno, že obě látky silně snižují aktivitu tohoto enzymu, který je zodpovědný za konverzi aminokyselin na příslušné ketokyseliny a naopak.¹⁵³⁾

U suspenzních kultur *Scutellaria baicalensis*, které jsou na našem pracovišti pěstovány již 4 roky, bylo dosaženo trvale produkční linie. Obsah baicalinu a baicaleinu v jednotlivých pasážích sice kolísá, ale součet jejich obsahů byl u posledních 10 sledovaných pasáží vždy nad hranicí 2 %. Biotechnologickými metodami jako je elicítace a přidávání prekurzorů lze toto množství v kulturách dále zvýšit a dosáhnout až 4 % těchto flavonoidů v sušině.

Dále byla prokázána možnost převést tuto kulturu do bioreaktoru a produkovat biomasu *S. baicalensis* (respektive baicalin a baicalein) ve

větších množstvích touto biotechnologickou cestou. Kultivace v bioreaktoru ještě nebyla plně optimalizována, ale podaří-li se zvýšit produkci biomasy na hodnoty obvyklé u kultur pěstovaných v baňkách a aplikovat i stejné postupy pro zvýšení obsahu sekundárních metabolitů, lze v budoucnu počítat s produkcí 0,4 až 1,0 g baicaleinu na litr média.

7. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

Zkratky jsou vysvětleny v češtině. Pouze u výrazů, které nemají český překlad, nebo se český překlad nepoužívá, jsou u zkratk uvedeny názvy anglické.

12-HETE	12-hydroxy-5,8,10,14-eikosatetraenová kyselina
12-HPETE	12-hydroperoxy-5,8,10,14-eikosatetraenová kyselina
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
5-HPETE	5-hydroperoxy-6,8,11,14-eikosatetraenová kyselina
ADP	adenosindifosfát
ADP-Fe²⁺-TBARS	reaktivní deriváty thiobarbiturátů adované na komplex ADP a Fe ²⁺
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
cAMP	cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát
CIN	kyselina skořicová
CINNa	skořican sodný
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenasa 2
DAD	diodový detektor
DAG	diacylglycerol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyllový radikál
ELAM-1	endotheliální leukocytární adhezní molekula 1
GABA_A	receptory typu A pro γ -aminomáselnou kyselinu
HIV	Human Immunodeficiency Virus, virus způsobující ztrátu obranyschopnosti u člověka,
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HTLV	Human T-cells Leukemia Virus, virus způsobující lymfocytární leukémii u člověka
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula 1

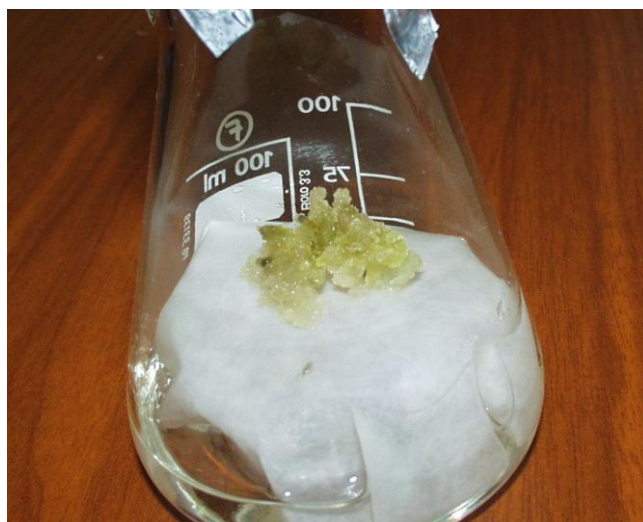
IL-4	interleukin 4
iNOS	inducibilní NO syntasa
IP₃	inositol-1,4,5-trifosfát
ISO	International Organization for Standardization
K36	flavonoid 5,7,2'-trihydroxy-6,8-dimethoxyflavon
L-Phe	L-fenylalanin
LTB₄	leukotrien B ₄
LTC₄	leukotrien C ₄
MAL	kyselina malonová
MALNa	malonan sodný
MCP	monocyární chemotaktický protein
MIP	makrofágový zánětlivý protein
MS	médium podle Murashigeho a Skooga
NAA	naftyloctová kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid v redukované formě
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát, redukovaná forma
NO	oxid dusnatý
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAL	Phenylalanin Ammonium-Lyase, EC 4.3.1.5
PG H₂	prostaglandin H ₂
PG I₂	prostaglandin I ₂
RSV	respirační syncytiální virus
SH-SY5Y	linie lidských neuroblastomů odvozená z rakovinných metastáz v kostní dřeni
T-buňky	lymfocyty typu T
TNF	faktor nekrotizující tumory
t-PA	Tissue type Plasminogen Activator
TRAP	peptid aktivující trombinový receptor
UV	ultrafialové záření

8. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

Obr. 36: Intaktní rostlina *Scutellaria baicalensis*



Obr. 37: Kalusová kultura *Scutellaria baicalensis*



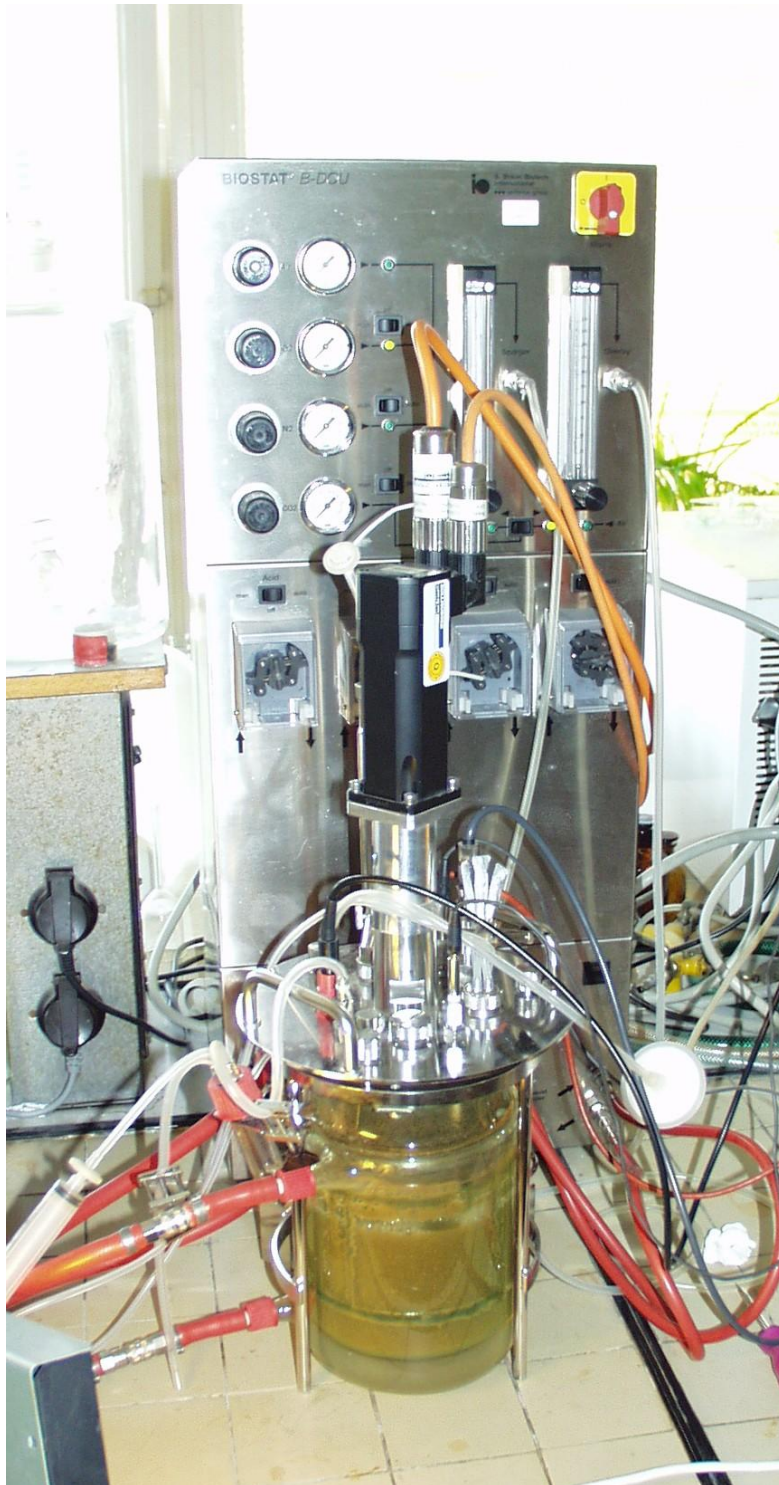
Obr. 38: Kořenová kultura *Scutellaria baicalensis*



Obr. 39: Kultivace suspenzních kultur *S. baicalensis* na třepačce.



Obr. 40: Kultivace v bioreaktoru BIOSTAT B-DCU



9. LITERATURA

1. Hsu H. Y.: *Oriental Materia Medica: a concise guide*, Oriental Healing Arts Institute, Long Beach 1986, s.152.
2. Valíček P. et al.: *Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny*, Svítání, Hradec Králové 1998, s. 244.
3. Brekhman I. I., Grinevitch M. A., Kyu K. B.: *Am. J. Chin. Med.* 9, 134 (1981).
4. Hoffman D.: *The Herbal Handbook: A User's Guide to Medical Herbalism*, Healing Arts Press, Rochester 1988, s. 77.
5. Cuellar M. J. et al.: *Fitoterapia* 72, 221 (2001).
6. McGuffin M. et al.: *American Herbal Product Association's Botanical Safety Handbook*, CRC Press, Boca Raton 1997, s. 105.
7. Wong M. et al.: *Arch. Gen. Psychiat.* 55, 1033 (1998).
8. Zhang Y. Y. et al.: *Biomed. Chromatogr.* 12, 31 (1998).
9. Duke J. A.: *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*, internet: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl?915>.
10. Kazautaka N. et al.: *Phytochemistry* 52, 885 (1999).
11. Zhang Y. Y. et al.: *J. Chin. Pharm. Sci.* 6, 182 (1997).
12. Miyaichi Y., Tomimori T.: *Nat. Med.* 52, 82 (1998).
13. Hara H. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 221, 193 (1992).
14. Hamada H., Hiramatsu M., Mori A.: *Arch. Biochem. Phys.* 306, 261 (1993).
15. Gao Z. et al.: *Appl. Magn. Reson.* 19, 35 (2000).
16. Yhao Z. H. et al.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1885 (1999).
17. Khazanov V. A., Saifutdinov R. R.: *Bull. Exp. Biol. Med.* 128, 942 (1999).
18. Gao Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 643 (1999).

19. Gao Z., Huang K., Xu H. B.: *Pharmacol. Res.* 43, 173 (2001).
20. Nakayama S. K. et al.: *Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi)* 101, 327 (1993).
21. Zhang J., Shen X.: *J. Nut. Environ. Med.* 7, 79 (1997).
22. Gao D. et al.: *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 90, 103 (1995).
23. Lim B. O. et al.: *Phytoterapy Res.* 16, 479 (1999).
24. Gabrielska J. et al.: *Z. Naturforsch.* 52, 817 (1997).
25. Sato T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 721 (1992).
26. Chen Z. Y. et al.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 73 (2000).
27. Anonymous: *GCI Magazine* 166, 52 (1999).
28. Rummel T.: *GCI Magazine* 164, 24 (1999).
29. Okuda H.: *Furi Rajikaru No Rinsho* 10, 13 (1996); In: *Chem. Abstr.* 127, 314297 (1997).
30. Sekiya K., Okuda H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 1090 (1982).
31. Parmentier J. H. et al.: *Hypertension* 37, 623 (2001).
32. Natarajan R. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90, 4947 (1993).
33. Kisch E. S. et al.: *Hypertension* 29, 796 (1997).
34. Takizava H., DelliPizzi A., Nasjletti A.: *Hypertension* 31, 866 (1998).
35. Wen Y. et al.: *Circulation Res.* 88, 70 (2001).
36. He Q., LaPointe M. C.: *Hypertension* 37, 478 (2001).
37. Yasuo T. et al.: *Am. J. Chin. Med.* 16, 145 (1988).
38. Alcaez M. J., Ferrandiz M. C.: *Ethnopharmacology* 21, 209 (1987).
39. Chung C. P. et al.: *Planta Med.* 61, 150 (1995).
40. Kubo M. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 32, 2724 (1984).
41. Lin C. C., Shieh D. E.: *Am. J. Chin. Med.* 21, 31 (1996).

42. Butenko I. G., Gladtschenko S. V., Galushko S. V.: *Agents Actions* 39, 49 (1993).
43. Bloomgarden Z. T.: *Diabetes Care* 21, 183 (1998).
44. Sun C. W. et al.: *Hypertension* 33, 414 (1999).
45. Sun C. W.: *Circulation Res.* 83, 1069 (1998).
46. Alonso-Galica M. et al.: *Stroke* 30, 2727 (1999).
47. Katoh A. et al.: *Circulation* 98, 2891 (1998).
48. Krakauer T., Li B. Q., Young H. A.: *FEBS Lett.* 500, 52 (2001).
49. Chang Y. L. et al.: *Mol. Pharmacol.* 60, 507 (2001).
50. Chi Y. S., Cheon B. S., Kim H. P.: *Biochem. Pharmacol.* 61, 1195 (2001).
51. Wakabayashi I.: *Pharm. Toxicol.* 84, 288 (1999).
52. Park B. K. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 425, 153 (2001).
53. Kim B. R. et al.: *Neuroscience Lett.* 309, 67 (2001).
54. Konoshima T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 531 (1992).
55. Nagai T. et al.: *Antivir. Res.* 19, 207 (1992).
56. Liu I. X., Durham D. G., Richards R. M. E.: *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 361 (2000).
57. Huang R. L. et al.: *Planta Med.* 66, 694 (2000).
58. Nagai T. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* 18, 295 (1995).
59. Blaszczyk T., Krzyzanowska J., Lamer-Zarawska E.: *Phytotherapy Res.* 14, 210 (2000).
60. Yang D. et al.: *Ann. Pharm. Fr.* 53, 138 (1995).
61. Yabu Y. et al.: *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 29, 599 (1998); In: Keiser J., Burri C.: *Trends in Parasitology* 17, 42 (2001).
62. Tsao T. F. et al.: *J. Dent. Res.* 61, 1103 (1982).
63. Lam T. L. et al.: *Life Sciences* 67, 2889 (2000).

64. Degidio A. J.: *Bioflavonoids*, Health World, San Francisco 1996, s. 14.
65. Wu J. A. et al.: *Am. J. Chin. Med.* 29, 69 (2001).
66. Li B. Q. et al.: *Cell. Mol. Biol. Res.* 39, 119 (1993).
67. Baylor N. W., Fu T., Yan Y. D. et al.: *J. Infect. Dis.* 165, 433 (1992).
68. Li B. Q. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 534 (2000).
69. Li B. Q. et al.: *Immunopharmacology* 49, 295 (2000).
70. Lee B. H. et al.: *Planta Med.* 66, 70 (2000).
71. Kim B. R. et al.: *Planta Med.* 67, 396 (2001).
72. Park H. J. et al.: *Eur. J. Cancer Prev.* 7, 465 (1998).
73. Chan F. L. et al.: *Cancer Lett.* 160, 219 (2000).
74. Lee M. J. et al.: *Nutr. Cancer* 34, 185 (1999).
75. So F. V. et al.: *Cancer Lett.* 112, 127 (1997).
76. Kuntz S., Wenzel U., Daniel H.: *Eur. J. Nut.* 38, 133 (1999).
77. Smolianinov E. S. et al.: *Eksp. Klin. Farmakol.* 60, 49 (1997).
78. Goldberg. V. E. et al.: *Eksp. Klin. Farmakol.* 97, 28 (1997).
79. Hsu S. L. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 425, 165 (2001).
80. Hiu K. M., Wang X. H., Xue H.: *Planta Med.* 66, 91 (2000).
81. Liao J. T. et al.: *Planta Med.* 64, 571 (1998).
82. Wang H. H., Liao J. T., Chen C. F.: *J. Ethnopharm.* 73, 185 (2000).
83. Kimura Y., Okuda H., Ogita Z.: *J. Nat. Prod.* 60, 598 (1997).
84. Kimura Y. et al.: *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 816 (1997).
85. Kimura Y. et al.: *Planta Med.* 67, 331 (2001).
86. Chen Z. Y. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 374, 41 (1999).
87. Nakajima T. et al.: *Planta Med.* 67, 132 (2001).
88. Nishioka T., Kawabata J., Aoyama Y.: *J. Nat. Prod.* 61, 1413 (1998).

89. Sieh D. E., Liu L. T., Liu C. C.: *Anticancer Res.* 20, 1861 (2000).
90. Kyo R. et al.: *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 1179 (1998).
91. Nagao M. et al.: *Environ. Mutagen* 3, 401 (1981).
92. D'Arcy P.: *Adverse Drug React Toxicol. Rev.* 12, 147 (1993).
93. DiPaola R. S. et al.: *New England J. Med.* 339, 785 (1998).
94. Hsieh T. et al.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42, 535 (1997).
95. De la Taille A. et al.: *Br. J. Urol.* 84, 845 (2000); In: Geliebter J.: *J. Nutrition* 131, 164 (2001).
96. Moyad M. A., Pienta K. J., Montie J. E.: *Adult Urol.* 54, 319 (1999); In: Geliebter J.: *J. Nutrition* 131, 164 (2001).
97. Tezuka Y. et al.: *J. Ethnopharm.* 77, 209 (2001).
98. Kim Y. O. et al.: *J. Ethnopharm.* 77, 183 (2001).
99. Ma S. et al.: *J. Ethnopharm.* 79, 205 (2002).
100. Hui K. M. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 64, 1415 (2002).
101. Lim B. O.: *J. Ethnopharm.* 84, 23 (2003).
102. Huen M. S. Y. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 66, 125 (2003).
103. Wu J. et al.: *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 96, 302 (2003).
104. Huen M. S. Y. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 66, 2397 (2003).
105. Hamada H. et al.: *Phytochemistry* 44, 615 (1997)
106. Whitaker R. J.: *Am. Chem. Soc. Symp. Series* 317, 347 (1986).
107. Fett-Neto A. G. et al.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 967 (1994).
108. Cooney J. M. et al.: *Phytochemistry* 53, 447 (2000).
109. Ushiyama M., Kumagai S., Furuya T.: *Phytochemistry* 28, 335 (1989).
110. Gil G., Ferreira Dos Santos P., Bullard C.: *Phytochemistry* 38, 629 (1995).

111. Botta B. et al.: *Heterocycles* 43, 2443 (1996).
112. Shimoda K., Hirata T.: *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 8, 255 (2000).
113. Hughes J. B., Shanks J., Vanderford M. et al.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 266 (1997).
114. Mironowicz A.: *Phytochemistry* 47, 1531 (1998).
115. Sakui N. et al.: *Phytochemistry* 31, 143 (1992).
116. Ellis B. E., Towers G. H. N.: *J. Biochem.* 118, 291 (1970).
117. Chan W., Staba E. J.: *Lloydia* 28, 55 (1965); In: Barbosa-Filho J. M., daCunha E. V. L., Gray A. I.: *Alkaloids Chem.Biol.* 54, 1 (2000).
118. Bentley R.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 19, 1 (1999).
119. Radman R. et al.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 91 (2003).
120. Procházka S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1998, s. 412.
121. Chasan R.: *Plant Cell* 7, 495 (1995) In: Řimáková J.: *Disertační práce*, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova 2005, s. 49.
122. Dörnenburg H., Knorr D.: *Enzyme Microb. Tech.* 17, 674 (1995).
123. Ebel J., Mithöfer A.: *Planta* 206, 335 (1998).
124. DiCosmo F., Misawa M.: *Biotechnol. Adv.* 13, 425 (1995).
125. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
126. Kolektiv autorů: *European Pharmacopoeia 4th Edition*, EDQM, Strasburg 2002.
127. Kolektiv autorů: *ČSN ISO 3534-1, Statistika - slovník a značky, část 1.: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny*, ČNI, Praha 1994, s. 4.
128. Kolektiv autorů: *Věstník SÚKL* 1, 6 (1994).

129. Kolektiv autorů: Fed. Reg. 62 (96) - 19 May 1997, 27463 (1997).
130. Reisenauer R.: Metody matematické statistiky, SNTL, Praha 1970, s. 31.
131. Jiménez V. M., Bangerth F.: Plant. Sci. 160, 247 (2001).
132. Sugiyama M.: Curr. Opin. Plant. Biol. 2, 61 (1999).
133. Lois R.: Planta 194, 498 (1994).
134. Nishikawa K. et al.: Natural Medicines 53, 209 (1999).
135. Zhang W. et al.: Plant. Sci. 162, 459 (2002).
136. Knobloch K. H., Bast G., Berlin J.: Phytochemistry 21, 591 (1982).
137. Zhong J. J., Kinoshita S., Yoshida T.: Biotechnol. Bioeng. 38, 653 (1991).
138. Kandill F. E. et al.: In vitro Cell. Dev- Pl. 36, 492 (2000).
139. Dewick P. M.: Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach, J. Wiley & Sons Ltd., Chichester 1997, s. 136.
140. Song J. Y., Lee J. S., An C. S.: J. Plant. Biol. 41, 277 (1998).
141. Epe B., Pflaum M., Boiteux S.: Mutat. Res. Genet. Tox. 299, 135 (1993).
142. Tuite E. M., Kelly J. M.: J. Photoch. Photobiol. B 21, 103 (1993).
143. Sakaki H. et al.: J. Biosci. Bioeng. 93, 338 (2002).
144. Hakamatsuka T., Ebizuka Y., Sankawa U.: Phytochemistry 30, 1481 (1991).
145. Himelblau E., Amasino R. M.: Curr. Opin. Plant Biol. 3, 205 (2000).
146. Shainberg O. et al.: J. Plant Physiol. 158, 1415 (2001).
147. Maksymiec W. et al.: J. Plant Physiol. 162, 1338 (2005).
148. Sowana D. D. et al.: Biochem. Eng. J. 12, 165 (2002).

149. Goldblum S. et al.: *Biotechnol. Progr.* 6, 383 (1990).
150. Martin J., Dušek J.: *Čes. slov. Farm.* 51, 277 (2002).
151. Martin J., Dušek J.: *Liečivé rastliny- Léčivé rostliny* 3, 74 (2003).
152. Martin J., Dušek J.: *Praktické lékárenství* 1, 27 (2005).
153. Boušová I. et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 957 (2005).
154. Pauls K. P.: *Biotechnol. Adv.* 13, 673 (1995).
155. Kováč J.: *Explantátové kultury rostlin*, Vydavatelství University Palackého, Olomouc 1995, s.13.
156. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K.: *Exp. Cel. Res.* 50, 151 (1968).
157. Schenk E. U., Hildebrandt A. C.: *Can. J. Bot.* 50, 199 (1972).