Farmacie 1/05 22.12.2004 13:28 Stránka 47
proLékaře.cz | 1.9.2024

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LIV – Číslo 1 – LEDEN 2005

VLIV MANGANATÝCH, KOBALTNATÝCH A NIKELNATÝCH IONTŮ NA RŮST A PRODUKCI KUMARINŮ V SUSPENZNÍ KULTUŘE *ANGELICA ARCHANGELICA* L.

SIATKA T., KAŠPAROVÁ M., SKLENÁŘOVÁ H.[1], SOLICH P.[1]

Katedra farmakognozie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové
[1]Katedra analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové

SOUHRN

Vliv manganatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L.

Rostlinná buňka reaguje na zvýšenou koncentraci kovů v prostředí různými mechanizmy. Patří mezi ně zvýšení tvorby proteinů tepelného šoku, metalothioneinů, fytochelatinů, aminokyselin (cysteinu, histidinu), organických kyselin (citronové, jablečné) nebo sekundárních metabolitů. Poslední mechanizmus je zkoumán pro možnost využití v explantátových kulturách ke stimulaci sekundárního metabolizmu, který je zdrojem farmaceuticky významných látek. V práci byly testovány manganaté (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 a 50 mM/l média), kobaltnaté a nikelnaté ionty (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200 a 500 μM/l média) jako potenciální elicitory produkce kumarinů. Současně byla sledována toxicita těchto kovů pro kulturu hodnocením vlivu na růst (charakterizován čerstvou a suchou hmotností biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace). Kultury byly kultivovány ve tmě a na světle. Bylo zjištěno, že růst kultur není ovlivněn manganem v koncentracích 0 až 2 mM, poté mírně klesá, při koncentraci 50 mM je o 20 % nižší při kultivaci ve tmě a o 30 % při kultivaci na světle ve srovnání s kontrolou. Kobalt v koncentracích 0 až 50 μM neovlivňuje významně růst kultury, vyšší koncentrace snižují nárůst biomasy, výrazněji při kultivaci na světle (při 500 μM Co o 60 %, ve tmě jen o 30 % ve srovnání s kontrolami). Nikl v koncentracích 0,1 až 200 μM neovlivňuje růst, v koncentraci 500 μM jej snižuje přibližně o 30 % ve srovnání s kontrolou při kultivaci na světle i ve tmě. Produkce kumarinů nebyla žádným kovem stimulována v porovnání s kontrolními kulturami. Pouze odstranění manganu z média v kultuře kultivované ve tmě zvýšilo produkci asi o 15 % oproti kontrole.

K l í č o v á s l o v a: *Angelica archangelica* L. – suspenzní kultura – růst – produkce kumarinů – mangan – kobalt – nikl – sekvenční injekční analýza

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 47–51

SUMMARY

Effect of Manganese (II), Cobalt (II), and Nickel (II) Ions on the Growth and Production of Coumarins in the Suspension Culture of *Angelica archangelica* L.

The plant cell reacts to an increased concentration of metals in the environment by various mechanisms. They include an increase in the formation of heat-shock proteins, metallothioneins, phytochelatins, amino acids (cysteine, histidine), organic acids (citric, malic), or secondary metabolites. The latter mechanism is being investigated for its possible use in explant cultures for the stimulation of secondary metabolism, which is the source of substances of pharmaceutical importance. The study tested manganese (II) (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, and 50 mM in the medium), cobalt (II), and nickel (II) ions (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200, and 500 μM in the medium) as potential elicitors of coumarin production. At the same time, toxicity of these metals for the culture was examined by evaluating their effect on growth (characterized by fresh and dry weight of biomass at the end of a two-week cultivation). Cultures were cultivated in the dark and in the light. It has been found that the growth of cultures is not influenced by manganese in concentrations ranging from 0 to 2 mM, then it slightly decreases, at a concentration of 50 mM it is lower by 20 % when cultivated in the dark and by 30 % when cultivated in the light in comparison with the control. Cobalt in concentrations of 0 to 50 μM does not significantly influence the growth of the culture, higher concentrations decrease the biomass yields, more markedly when cultivated in the light (at 500 μM Co by 60 %, in the dark only by 30 % in comparison with the controls). Nickel in concentrations of 0.1 to 200 μM does not influence growth, and in a concentration of 500 μM decreases it by approximately 30 % in comparison with the control both in the light and dark. Production of coumarins was not stimulated by any metal in comparison with the control cultures, only the remo-

Farmacie 1/05 22.12.2004 13:29 Stránka 48
proLékaře.cz | 1.9.2024

val of manganese from the medium in the culture cultivated in the dark increased production by about 15 % versus the control.

K e y w o r d s: *Angelica archangelica* L. – suspension culture – growth – coumarins – manganese – cobalt – nickel – sequential injection analysis

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 47–51 *Má*

Úvod

Rostlinné tkáňové kultury představují slibný zdroj pro získávání látek přírodního původu. Jednou z hlavních příčin, která zatím až na několik výjimek neumožňuje komerční využití, je nízká produkce většiny sekundárních metabolitů rostlinnými buňkami v podmínkách *in vitro* [1,2]. Jsou zkoumány různé metody a postupy, jak tuto produkci zvýšit. Patří mezi ně i elicitace, jež je založena na faktu, že akumulace mnoha sekundárních látek v rostlinách je součástí jejich obranné reakce vůči působení patogenů nebo vlivů prostředí [3]. Faktory vyvolávající obranné reakce se obecně označují jako elicitory nebo stresory. Lze je rozdělit na biotické (např. viry, bakterie, houby) a abiotické, které mohou být fyzikální (např. záření, horko, chlad) nebo chemické (např. těžké kovy, ozon) [1, 4]. Mechanizmy účinku biotických a abiotických elicitorů jsou odlišné a nejsou zcela známy. Stejně tak mnohdy chybí detailní znalost biosyntetických drah sekundárního metabolizmu. Vliv elicitoru na rostlinnou tkáňovou kulturu nelze tedy jednoduše předpovědět a musí být empiricky zkoušen [2].

V této práci je sledováno působení manganatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů jako potenciálních elicitorů v suspenzní kultuře anděliky lékařské.

POKUSNÁ ČÁST

Chemikálie

Chlorid thiaminia *puriss.*, chlorid pyridoxinia *puriss.* Koch-Light Laboratories, Colnbrook; skopoletin č. Fluka, Buchs; myoinositol, kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová Sigma, St. Louis; 6-benzylaminopurin reinst Serva, Heidelberg; glycin č., dihydrogenfosforečnan draselný *p.a.*, hydrogenfosforečnan sodný *p.a.*, kyselina nikotinová č., chlorid kobaltnatý *p.a.*, chlorid nikelnatý *p.a.*, síran manganatý *p.a.*, methanol *p.a.*, sacharosa *p.a.* Lachema, Brno.

Přístroje

Autokláv PS 20A, Chirana, Brno; roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha; analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen; laboratorní odstředivka MPW 342, Med-Instruments, Varšava; laboratorní třepačka, IKA, Staufen; pístová pumpa, Alitea Instruments, Seattle; osmicestný selekční ventil, Vici Valco Istruments, Brockville; spektrofluorimetr FS 970, Spectra-Physics, Darmstadt.

Suspenzní kultura anděliky lékařské

K pokusům byla použita devítiletá suspenzní kultura *Angelica archangelica* L., která byla kultivována na roleru v tekutém živném médiu podle Murashigeho a Skooga [5] (MS) s přídavkem 2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 0,4 mg/l 6-benzylaminopurinu ve tmě a na světle (světelná perioda 16 hod světlo/8 hod tma). Pasážována byla ve čtrnáctidenním intervalu.

Účinek kovových iontů byl sledován po přepasážování na MS média s různým obsahem příslušného iontu; u manganatých iontů to byly koncentrace 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 a 50 mmol/l média, u kobaltnatých a nikelnatých iontů byly testovány koncentrace 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200 a 500 µmol/l média. Po čtrnáctidenní kultivaci byly buňky odděleny od média odsátím za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a zváženy pro zjištění čerstvé hmotnosti, poté byly usušeny a zváženy pro určení suché hmotnosti. Čerstvá a suchá hmotnost sloužily k hodnocení růstu kultur. V usušených buňkách a v médiu byl stanoven obsah kumarinů. Statistické vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí t-testu pro minimálně 3 členy souboru a hladinu významnosti p=0,05.

Stanovení kumarinů

Obsah kumarinů byl stanovován fluorimetricky technikou sekvenční injekční analýzy [6, 7]. Podmínky stanovení byly následující: nosný proud–voda, průtoková rychlost 3 ml/min, mísící cívka 1,5 ml, dávkovaný objem vzorku 40 µl, dávkovaný objem fosforečnanového tlumivého roztoku o koncentraci 0,066 mol/l a pH 6 100 µl, excitační vlnová délka 345 nm, emisní vlnová délka 390 nm. Jako standard byl použit skopoletin. Obsah kumarinů v buňkách byl vyjadřován v mg skopoletinu na g sušiny, v médiu v mg skopoletinu na litr média.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Možnost využití solí kovů ke stimulaci produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách skýtá ve srovnání s biotickými elicitory několik výhod: jsou snadno dostupné, relativně levné, mají definované složení, snadněji se s nimi pracuje.

Mangan patří mezi esenciální stopové prvky pro rostliny [8], je mimo jiné koenzymem nebo aktivátorem mnoha dehydrogenas, hydroxylas, dekarboxylas a dalších enzymů [4, 9]. Rovněž nikl se řadí k esenciálním mikroelementům [11]. Je nezbytnou součástí ureázy, která je nutná pro hydrolýzu močoviny vznikající při metabolizmu aminokyselin a nukleotidů; nedostatečná aktivita enzymu vede k akumulaci močoviny v rostlinných tkáních a následně ke vzniku nekrotických lézí na listech [11, 12]. O dalších účincích niklu, jež nemohou být ve vztahu k tomu, že je strukturální komponentou ureázy, je známo jen velmi málo [4, 10]. Bylo například pozorováno, že nikl zvyšuje účinnost somatické embryogeneze v kalusové kultuře *Setaria italica* [13]. Kobalt je jako součást vitaminu B_{12} esenciálním prvkem pro člověka, živočichy a prokaryonty, v rostlinách se tento vitamin nevyskytuje a není známa ani jiná biologická funkce pro kobalt ve vyšších rostlinách [14], je nezbytný pouze pro bobovité rostliny se

proLékaře.cz | 1.5.2024

Tab. 1. Vliv manganatých iontů na růst suspenzní kultury anděliky lékařské a produkci kumarinů

Koncentrace Mn^{2+} (µmol/l)	kultivace ve tmě				kultivace za světla			
	růst kultury		obsah kumarinů		růst kultury		obsah kumarinů	
	čerstvá hmotnost (g)	suchá hmotnost (mg)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)	čerstvá hmotnost (g)	suchá hmotnost (mg)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)
0,0	5,96±0,42	354±6	1,15±0,04	2,90±0,05	5,13±0,06	333±6	1,05±0,02	1,85±0,05
0,1	6,27±0,07	367±3	0,99±0,07	2,47±0,07	5,50±0,07	347±2	0,94±0,02	1,93±0,01
0,2	6,21±0,17	372±5	0,93±0,02	2,35±0,08	5,20±0,18	348±4	0,86±0,01	1,67±0,09
0,5	5,96±0,20	364±5	0,85±0,06	2,03±0,08	5,27±0,16	348±4	0,81±0,01	1,28±0,07
1,0	6,02±0,14	362±1	0,78±0,02	1,94±0,02	5,45±0,07	326±11	0,78±0,01	1,24±0,11
2,0	5,85±0,12	360±8	0,68±0,02	1,52±0,06	5,37±0,14	337±6	0,72±0,02	0,87±0,03
5,0	5,67±0,08	360±9	0,63±0,10	1,11±0,04	5,08±0,10	296±5	0,62±0,01	0,43±0,05
10,0	5,26±0,26	341±11	0,58±0,01	0,96±0,04	4,75±0,22	288±4	0,63±0,01	0,41±0,01
20,0	5,05±0,11	332±5	0,49±0,02	1,07±0,03	4,09±0,15	262±3	0,58±0,01	0,52±0,04
50,0	4,82±0,03	315±3	0,44±0,01	1,34±0,10	3,60±0,24	254±8	0,59±0,01	0,74±0,04

Tab. 2 Vliv kobaltnatých iontů na růst suspenzní kultury anděliky lékařské a produkci kumarinů

Koncentrace Co^{2+} (µmol/l)	kultivace ve tmě				kultivace za světla			
	růst kultury		obsah kumarinů		růst kultury		obsah kumarinů	
	čerstvá hmotnost (g)	suchá hmotnost (mg)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)	čerstvá hmotnost (g)	suchá hmotnost (mg)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)
0,0	6,43±0,13	384±6	0,85±0,05	2,03±0,09	5,89±0,10	350±1	0,88±0,01	1,66±0,05
0,1	6,43±0,21	380±3	0,94±0,06	1,98±0,17	5,96±0,20	353±10	0,87±0,04	1,67±0,14
0,5	6,64±0,10	385±3	0,91±0,08	2,12±0,04	5,90±0,22	348±10	0,87±0,08	1,53±0,05
1,0	6,17±0,35	384±4	0,92±0,02	1,84±0,30	5,89±0,02	343±6	0,89±0,02	1,46±0,04
5,0	6,24±0,42	380±2	0,90±0,04	2,10±0,12	5,70±0,23	332±6	0,83±0,02	1,15±0,12
10,0	6,58±0,13	386±5	0,93±0,04	2,00±0,03	5,51±0,08	321±8	0,81±0,01	1,09±0,07
50,0	6,48±0,20	380±3	0,76±0,04	1,49±0,03	5,69±0,15	305±5	0,77±0,04	0,08±0,01
100,0	6,54±0,50	358±24	0,74±0,05	0,98±0,03	5,27±0,10	287±3	0,82±0,01	0,09±0,02
200,0	6,22±0,38	356±27	0,50±0,10	0,67±0,07	4,44±0,19	243±9	0,57±0,03	0,78±0,06
500,0	4,64±0,31	352±11	0,56±0,02	2,43±0,14	2,12±0,41	146±13	0,35±0,03	1,93±0,10

symbiotickými bakteriemi fixujícími atmosférický dusík v kořenových hlízkách [15]. Mangan, nikl i kobalt mohou ve vyšších množstvích působit na rostliny toxicky [15–17], přičemž citlivost rostlin k nim se může lišit mezi druhy, případně i uvnitř téhož druhu [4, 18]. Byly popsány odrůdy čiroku [19] nebo tritikále [20] odolné vůči zvýšené koncentraci manganu. Existují rostlinné druhy, které endemicky rostou na půdách s vysokým obsahem příslušného kovu a dokonce jej bez poškození hromadí ve svém organizmu, často v množstvích vyšších než 1000 µg na g sušiny; označují se jako hyperakumulátory, např. *Crotalaria cobalticola* [14] nebo *Nyssa sylvatica* [15] hromadí kobalt, *Alyssum lesbiacum*, *Thlaspi goesingense* [14], *Alyssum murale* [21] akumulují nikl.

Manganaté, kobaltnaté a nikelnaté ionty byly testovány v širokém rozmezí koncentrací jako potenciální elicitory produkce kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské. Současně byla sledována i jejich případná toxicita pro kulturu, a to hodnocením vlivu na růst, který byl charakterizován čerstvou a suchou hmotností biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace. Kultury byly kultivovány ve tmě a na světle, protože světelné podmínky mohou výrazně ovlivnit růst rostlinných kultur i tvorbu sekundárních metabolitů [22–24].

Vliv manganatých iontů je shrnut v tabulce 1. Manganaté ionty jsou obvyklou součástí média podle Murashigeho a Skooga (MS médium) v koncentraci 0,1 mM. Růst kultury anděliky lékařské není v rozmezí koncentrací 0 až 2 mM výrazně ovlivněn, poté s rostoucí koncentrací mírně klesá, při nejvyšší použité koncentraci 50 mM je přibližně o 20 % nižší při kultivaci ve tmě a o 30 % při kultivaci na světle ve srovnání s kontrolou. Produkce kumarinů se v kultuře kultivované ve tmě zvýšila při odstranění síranu manganatého asi o 15 % oproti kontrole, pak se zvyšující se koncentraci manganatých iontů obsah kumarinů postupně klesá, při koncentraci 20 a 50 mM byl zaznamenán mírný vzestup kumarinů v médiu, jenž zřejmě souvisí s osmotickým stresem vyvolaným relativně vysokými koncentracemi Mn^{2+}. Při kultivaci za světla byly nalezeny obdobné změny produkce kumarinů s tím rozdílem, že množství kumarinů v buňkách při kultivaci v nepřítomnosti manganatých iontů se nezvýšilo ve srovnání s kontrolní kulturou ve standardním MS médiu. Rozdílné působení zvýšených koncentrací manganatých iontů (1 a 10 mM) na růst kultury a produkci kardenolidů v závislosti na světelných podmínkách bylo pozorováno v buněčné kultuře *Digitalis lanata* [25]. Růst kultury byl snížen při kultivaci na světle, ve tmě nebyl ovlivněn. Tvorba kardenolidů byla stimulována ve tmě, nikoliv při kultivaci na světle. V prýtové kultuře *Digitalis obscura* nepůsobilo zvýšení koncentrace manganatých iontů pozitivně na růst ani na produkci karde-

proLékaře.cz | 1.5.2024

Tab. 3 Vliv nikelnatých iontů na růst suspenzní kultury anděliky lékařské a produkci kumarinů

Koncentrace Ni^{2+} (µmol/l)	kultivace ve tmě				kultivace za světla			
	růst kultury		obsah kumarinů		růst kultury		obsah kumarinů	
	čerstvá hmotnost (g)	suchá hmotnost (mg)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)	čerstvá hmotnost (g)	suchá hmotnost (mg)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)
0,0	6,53±0,22	414±4	0,55±0,01	2,22±0,25	6,22±0,21	382±11	0,71±0,04	3,12±0,20
0,1	6,11±0,25	376±20	0,56±0,03	1,94±0,22	6,28±0,13	372±7	0,64±0,02	2,85±0,10
0,5	6,70±0,05	407±3	0,48±0,01	1,90±0,07	6,16±0,22	392±1	0,66±0,03	2,84±0,04
1,0	6,48±0,21	411±3	0,47±0,02	1,99±0,17	6,47±0,36	387±5	0,70±0,04	3,10±0,38
5,0	6,60±0,02	406±7	0,50±0,01	1,97±0,14	5,92±0,12	402±14	0,56±0,03	3,01±0,08
10,0	6,49±0,21	407±4	0,47±0,01	1,84±0,12	5,65±0,29	406±10	0,53±0,03	2,81±0,17
50,0	6,74±0,09	408±2	0,53±0,01	1,88±0,09	5,76±0,26	398±9	0,52±0,01	2,40±0,10
100,0	6,84±0,09	413±5	0,47±0,01	1,44±0,09	5,55±0,09	413±13	0,43±0,03	2,18±0,11
200,0	6,69±0,06	424±9	0,44±0,02	1,25±0,10	5,94±0,11	415±12	0,46±0,02	1,87±0,02
500,0	4,87±0,30	270±13	0,30±0,02	1,15±0,06	4,02±0,36	300±24	0,40±0,02	1,80±0,07

nolidů, koncentrace 10 mM byla pro kulturu již toxická [26]. Snížení koncentrace síranu manganatého v médiu stimulovalo růst suspenzní kultury *Saponaria officinalis* i produkci saponinů [27]. Změny koncentrace manganatých iontů v médiu neměly vliv na růst transformované kořenové kultury *Stizolobium hassjoo* ani na obsah L-DOPA, jíž tato kultura produkuje [28]. Odstranění manganatých iontů z média vedlo ke zvýšené akumulaci protilátek v transgenní tabákové suspenzní kultuře [29].

Výsledky působení kobaltnatých iontů na kulturu anděliky lékařské jsou uvedeny v tabulce 2. Kobaltnaté ionty jsou v koncentraci 0,1 µM normální součástí MS média. Jejich odstranění z média stejně jako zvýšení koncentrace až do 50 µM nevedlo k výrazné změně růstu kultury na světle ani ve tmě. Při vyšších koncentracích došlo k poklesu nárůstu biomasy, který je výraznější při kultivaci na světle (při 500 µM Co^{2+} o 60 %, ve tmě jen o 30 % ve srovnání s kontrolami). Koncentrace 1000 µM již byla letální (data neuvedena). Změny koncentrace kobaltnatých iontů v rozsahu 0 až 10 µM při kultivaci ve tmě neměly vliv na tvorbu kumarinů, pak obsah kumarinů v buňkách i v médiu klesá; při koncentraci 500 µM výrazně vrostlo množství kumarinů v médiu, což je patrně vyvoláno poškozením buněk suspenzní kultury. Při kultivaci na světle je obsah kumarinů v buňkách ve srovnání s kontrolou beze změny až do koncentrace 100 µM Co^{2+}, pak dochází k jeho poklesu. Obsah kumarinů v médiu klesá již od koncentrace 0,5 µM Co^{2+} k minimu při 50 a 100 µM. Při koncentraci 500 µM došlo k prudkému zvýšení obsahu kumarinů v médiu, které koresponduje se snížením obsahu v buňkách a inhibicí růstu, a je tedy nejspíš důsledkem toxického působení kobaltnatých iontů na suspenzní kulturu *Angelica archangelica*. Vliv kobaltnatých iontů byl sledován v suspenzní kultuře *Taxus chinensis* [30]. Chlorid kobaltnatý neovlivnil, podobně jako v suspenzní kultuře *Angelica archangelica*, až do koncentrace 100 µM růst kultury, avšak produkce paklitaxelu byla stimulována. Pozitivní účinek zvýšené koncentrace chloridu kobaltnatého (2 µM) na tvorbu saponinů bez negativního ovlivnění růstu byl pozorován v kalusové kultuře *Agave amaniensis* [31]. Odstranění kobaltnatých iontů z média vedlo ke zvýšení produkce betakyanů v suspenzní kultuře *Beta vulgaris* [32]. Ovlivnění růstu kobaltnatými ionty bylo zkoumáno u suspenzních kultur *Rauwolfia serpentina*, *Silene cucubalus* a *Crotalaria cobalticola* [14]. U prvních dvou kultur byl efekt rostoucí koncentrace kobaltu v médiu obdobný jako v kultuře *Angelica archangelica*, zatímco kultura *Crotalaria cobalticola* dobře rostla i při desetinásobku koncentrace toxické pro předchozí kultury. *Crotalaria cobalticola* patří, jak bylo zmíněno výše, k rostlinným hyperakumulátorům kobaltu.

Účinek nikelnatých iontů v suspenzní kultuře anděliky lékařské shrnuje tabulka 3. Nikelnaté ionty nejsou na rozdíl od manganatých a kobaltnatých iontů součástí MS média. Jejich přídavek do média v koncentraci 0,1 až 200 µM neovlivnil ve srovnání s kontrolou růst kultury ani při kultivaci na světle ani ve tmě, koncentrace 500 µM jej snížila přibližně o 30 %. Koncentrace 1000 µM kulturu zahubila (data neuvedena). Produkce kumarinů nebyla v porovnání s kontrolní kulturou zvýšena, při vyšších koncentracích nikelnatých iontů (od koncentrace 100 µM při kultivaci ve tmě a 10 µM při kultivaci na světle) dochází k jejímu snížení. Toxicita nikelnatých iontů byla studována v suspenzní kultuře *Dianthus caryophyllus*; růst kultury nebyl ovlivněn do koncentrace 10 µM Ni^{2+}, vyšší koncentrace jej snížily [33]. Naproti tomu kultura *Angelica archangelica* toleruje nikelnaté ionty bez inhibice růstu až do koncentrace 200 µM. Někteří autoři doporučují přídavek nikelnatých iontů ke standardnímu MS médiu za účelem aktivace ureázy, aby se zabránilo akumulaci močoviny v rostlinných tkáních, a tím jejich poškození při kultivaci na MS médiu [12]. Na základě pozorování v kultuře *Angelica archangelica* se obohacení MS média niklem nezdá nezbytné, neboť jeho přídavek v různých koncentracích nezvýšil ani růst kultury ani obsah kumarinů. V suspenzní kultuře *Taxus chinensis* nepůsobil chlorid nikelnatý v koncentracích 10 až 100 µM negativně na růst, v koncentraci 50 µM stimuloval produkci paklitaxelu v porovnání s kontrolní kulturou, nižší i vyšší koncentrace nikelnatých iontů tvorbu paklitaxelu neovlivnily [30].

Vysvětlení výše uvedených faktů a pozorování není jednoduché. Bylo popsáno několik různých mechanizmů, jimiž reaguje rostlinná buňka na zvýšenou koncentraci iontů kovů ve svém prostředí. Dochází ke vzrůstu aktivity antioxidačních enzymů [34], k vyšší tvorbě proteinů tepelného šoku, metalothioneinů [35], fytochelatinů [36], amino-

proLékaře.cz | 1.5.2024

kyselin (např. cysteinu [14]), histidinu [37]), organických kyselin (např. kyseliny citronové, kyseliny jablečné) [38]), sekundárních metabolitů [39]). Posledně jmenovanému mechanizmu je věnována výzkumná pozornost kvůli možnosti jeho využití v podmínkách *in vitro* pro stimulaci sekundárního metabolizmu, jenž je zdrojem mnoha farmaceuticky významných látek. Jednotlivé mechanizmy včetně zvýšení produkce sekundárních metabolitů se ovšem v rostlinách a rostlinných explantátových kulturách uskutečňují rozdílnou měrou v závislosti na rostlinném druhu a druhu kovu – může se jich uplatnit několik najednou, přičemž mohou, každý s jinou intenzitou, probíhat paralelně nebo na sebe vzájemně navazovat; některé mohou být naopak vyjádřeny jen velmi slabě nebo vůbec ne.

Závěrem lze konstatovat, že na základě dosažených výsledků se manganaté, kobaltnaté a nikelnaté ionty nejeví jako vhodné elicitory produkce kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře GA Univerzity Karlovy (grant č. 155/2002/B-BIO/FaF) a výzkumného záměru č. CEZ: J13/98:111600003.

LITERATURA

1. **Wu, J., Lin, L.:** Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002; 59, 51.
2. **Bhagwath, S. G., Hjortso, M. A.:** J. Biotechnol., 2000; 80, 159.
3. **Radman, R. et al.:** Biotechnol. Appl. Biochem., 2003; 37, 91.
4. **Procházka, S. et al.:** Fyziologie rostlin. Praha, Academia, 1998.
5. **Murashige, T., Skoog, F.:** Physiol. Plant., 1962; 15, 473.
6. **Siatka, T., Solich, P., Kotyk, R.:** Pharmazie, 1998; 53, 273.
7. **Paseková, H., Polášek, M., Solich, P.:** Chem. Listy, 1999; 93, 354.
8. **Welch, R. M.:** Crit. Rev. Plant Sci., 1995; 14, 49.
9. **Mori, T., Sakurai, M., Sakuta, M.:** Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2000; 62, 135.
10. **Gerendas, J. et al.:** J. Plant Nutr. Soil Sci., 1999; 162, 241.
11. **Gerendas, J. et al.:** Plant Soil, 1998; 203, 127.
12. **Witte, C.-P. et al.:** Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2002; 68, 103.
13. **Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P.:** Euphytica, 1998; 101, 319.
14. **Oven, M. et al.:** Phytochemistry, 2002; 60, 467.
15. **Chatterjee, J., Chatterjee, C.:** Plant Sci., 2003; 164, 793.
16. **Nogueira, M. A., Cardoso, E. J. B. N., Hampp, R.:** Plant Soil, 2002; 246, 1.
17. **Yang, X. et al.:** J. Plant Nutr., 1996; 19, 73.
18. **Pollard, A. J. et al.:** Crit. Rev. Plant Sci., 2002; 21, 539.
19. **Mgema, W G., Clark, R. B.:** J. Plant Nutr., 1995; 18, 983.
20. **Zhang, X. G., Jessop, R. S., Ellison, F.:** Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1999; 30, 2399.
21. **Abou Auda, M. M. et al.:** J. Plant Physiol., 2002; 159, 1087.
22. **Mukherjee, S., Ghosh, B., Jha, S.:** J. Biotechnol., 2000; 76, 73.
23. **Szakiel, A. et al.:** Plant Physiol. Biochem., 2003; 41, 271.
24. **Chattopadhyay, S. et al.:** J. Biosci. Bioeng., 2002; 93, 215.
25. **Ohlsson, A. B., Berglund, T.:** J. Plant Physiol., 1989; 135, 505.
26. **Gavidia, I., Pérez-Bermúdez, P.:** Phytochemistry, 1997; 45, 81.
27. **Fulcheri, C., Morard, P., Henry, M.:** J. Agric. Food Chem., 1998; 46, 2055.
28. **Sung, L.-S., Huang, S.-Y.:** Biotechnol. Prog., 2002; 16, 1135.
29. **Tsoi, B. M. Y., Doran, P. M.:** Biotechnol. Appl. Biochem., 2002; 35, 171.
30. **Zhang, C.-H., Wu, J.-Y.:** Enzyme Microb. Technol., 2003; 32, 71.
31. **Sri Andrijany, V., Indrayanto, G., Adi Soehono, L.:** Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1999; 55, 103.
32. **Akita, T., Hina, Y., Nishi, T.:** Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002; 66, 902.
33. **Gabrielli, R., Gori, P., Aniello, S.:** Plant Sci., 1995; 104, 225.
34. **Tewari, R. K. et al.:** Plant Sci., 2002; 162, 381.
35. **Hall, J. L.:** J. Exp. Bot., 2002; 53, 1.
36. **Cobbett, C. S.:** Curr. Opin. Plant Biol., 2000; 3, 211.
37. **Krämer, U. et al.:** Nature, 1996; 379, 635.
38. **McGrath, S. P., Zhao, F.-J.:** Curr. Opin. Biotechnol., 2003; 14, 277.
39. **Zheng, Z., Wu, M.:** Plant Sci., 2004; 166, 507.

Došlo 2. 2. 2004.
Přijato ke zveřejnění 2. 3. 2004.

PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: siatka@faf.cuni.cz

NOVÉ KNIHY

Fricke, U., Klaus, W.: **Neue Arzneimittel, Band 14, Fakten und Bewertung von 1999 bis 2002 zugelassenen Arzneimittel.** Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2004, 760 s., 70 obr., 73 tab., cena 76 euro.

Nejnovější svazek známé řady „Neue Arzneimittel“ tvoří monografie 51 léčiv, které v letech 1999 až 2002 byly uvedeny na trh v SRN a EU a v řadě případů jsou již k dispozici i u nás. Jak tomu bylo poprvé u předcházejícího svazku, léčiva rozdělená do skupin podle ATC vždy uvádí shrnující obecný úvod. Již letmý pohled na toto třídění jasně naznačuje trend výzkumu a vývoje léčiv poslední doby. Ukazuje, že co do počtu do terapie zavedených nových léčiv stojí v popředí dvě skupiny. První jsou léčiva zažívacího traktu a metabolizmu ve zvýšené míře zastoupena antidiabetiky, druhou cytostatika a imunomodulancia. Několika léčivy jsou zastoupena i antitrombika, antiinfektiva typu antibiotik a antivirotik a psychofarmaka. Standardně sestavené monografie obsahuje všechny základní informace, které lékař potřebuje pro preskripci a lékárník v expedici. Jsou to údaje o farmakologii a farmakokinetice, o mechanizmu účinku a o indikacích, kontraindikacích i vedlejších projevech. Není možno tu informovat o všech léčivech a je možno jen upozornit na ty z nich, které podle autorů představují pokrok v terapii. Jsou jimi např. z antidiabetik glitazony (rosiglitazon a pioglitazon) a repaglinid, z enzymů agalsidasy pro terapii Fabryho syndromu, ze syntetických steroidů typu 19-nortestosteronu abortivum mifepriston, z antiinfektiv syntetické antibiotikum linezolid a antivirotikum fomivirsen, z cytostatik vedle monoklonálních protilátek (rituximamb, trastuzumab a alemtuzumab) i syntetický retinoid bexaroten a antileukemikum imatinib, nebo v terapii revmatické artritidy používaná antisupresiva (infliximab, etanercept, leflunomid).

A. Borovanský